



**Bárbara Joana Martins
Leite Ferreira**

**Formação e transformação *in vitro* da hidroxiapatite
e seus precursores. Influência da composição inicial
do meio e da temperatura.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Materiais, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Clara Ferreira Magalhães, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

**Prof^a. Doutora Ana Maria
Bastos Costa Segadães**

Professora Associada com Agregação do Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro da Universidade de Aveiro

vogais

**Prof. Doutor Adélio Alcino
Sampaio Castro Machado**

Professor Catedrático do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

**Doutor José Carlos Magalhães
Duque da Fonseca**

Professor Auxiliar do Departamento de Metalúrgica e de Materiais da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

**Doutora Maria Clara Ferreira
Magalhães**

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais pelo incentivo e apoio que sempre me deram.

Ao meu marido, Adão, pela compreensão, carinho e incentivo dados ao longo da dissertação.

À Doutora Clara Magalhães pela sua orientação e por me ter iniciado no estudo dos fosfatos de cálcio.

Ao Doutor Rui Correia, do Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro da Universidade de Aveiro, pela amizade, disponibilidade, sugestões e pela colaboração prestada no decorrer desta dissertação.

A todos os colegas dos laboratórios de Química Inorgânica e Materiais (Dep.^o de Química) e de Biomateriais (Dep.^o de Cerâmica e do Vidro) pelo apoio, paciência e incentivo demonstrados. Em especial, à Eng.^a Marta Ferro e ao Doutor Agathopoulos pela sua disponibilidade e ajuda na aquisição das imagens de Microscopia Electrónica de Varrimento.

À Eng.^a Celeste Azevedo pela ajuda na aquisição de todos os espectros de Raman e termogravimetrias.

À Eng.^a Conceição pela ajuda prestada na aquisição dos difractogramas de pó e parâmetros de rede.

Por fim, à Universidade de Aveiro pela bolsa concedida para a realização desta dissertação.

resumo

O objectivo desta dissertação é estudar a possível influência da composição inicial do meio, em especial do pH, e da temperatura na formação e transformação *in vitro* de fosfatos de cálcio. Para tal, a dissertação inclui um capítulo de revisão, onde são apresentadas as principais características de alguns dos fosfatos de cálcio biologicamente relevantes (ACP, DCPD, OCP, TCP e HA). Após esta revisão, necessária para compreender e interpretar os resultados obtidos, são apresentados os métodos e as técnicas experimentais utilizadas. Seguidamente são apresentados e interpretados os resultados obtidos experimentalmente.

Como principal conclusão deste trabalho, poder-se-á afirmar que a composição inicial do meio e a temperatura de síntese têm influência nas fases cristalinas que se formam, sendo a composição inicial do meio o factor que mais condiciona a composição, a estrutura cristalina e as transformações *in vitro* dos diferentes fosfatos de cálcio estudados.

Palavras Chave: fosfatos de cálcio, DCPD, OCP, hidroxiapatite, HA carbonatada do tipo B, formação *in vitro*, mecanismos de substituição, envelhecimento em SBF.

abstract

The main purpose of this dissertation is to study the influence of initial solution composition, specially pH, and temperature in the *in vitro* formation and transformation of calcium phosphates.

The dissertation includes one section, where the main properties of relevant biological calcium phosphates are review. Next the experimental techniques are presented. At the end, the experimental results are presented and possible explanations given.

The main conclusion of this work is that *in vitro* formation and transformation of calcium phosphates are affected by the three experimental parameters studied.

Keywords: calcium phosphates, DCPD, OCP, hydroxyapatite, Type B carbonated apatite, *in vitro* formation, substitution mechanisms, maturation, in SBF, phase transformation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A utilização de materiais no corpo humano é muito antiga, mas durante muitos anos poucas diferenças houve entre os materiais implantados e os que eram produzidos para outros fins. A necessidade de compreensão das surpreendentes propriedades dos materiais de origem biológica e do modo como as células os fabricam, levou ao surgimento de materiais compatíveis com o organismo [1], designados por *BIOMATERIAIS*.

A hidroxiapatite (HA) foi o primeiro material a ser deliberadamente sintetizado e processado para posterior implantação no corpo humano. O termo *apatite* é proveniente da palavra grega “*apato*”, que significa engano. Werner, um mineralogista que em 1790 assim baptizou o mineral, não imaginava como o nome tinha tanto de verdade nas aplicações biomédicas. Na realidade, as apatites sintéticas conseguem “enganar” o organismo, não sendo reconhecidas como corpo estranho, devido à sua semelhança química com a hidroxiapatite biológica [1], principal constituinte da fase inorgânica dos tecidos calcificados do organismo humano (dentina, esmalte dentário e ossos) [2]. Apatite é uma designação geral para os minerais com a seguinte composição:



em que M é um catião metálico (p. ex.: Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+}), Z poderá ser por exemplo P, V, As, Si, Ge, Cr e X pode ser OH^- , CO_3^{2-} , O^{2-} , F^- , Cl^- . As apatites mais comuns são a fluoroapatite (FAP), $Ca_{10}(PO_4)_6F_2$; a cloroapatite (CIAP), $Ca_{10}(PO_4)_6Cl_2$; e a hidroxiapatite, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ [1].

Apesar da HA ser o principal constituinte da fase inorgânica dos tecidos calcificados do corpo humano, têm sido identificados outros fosfatos de cálcio, associados ou não à HA, com elevado interesse biológico. Nestes estão incluídos: (a) o fosfato de cálcio amorfo (ACP); (b) a brushite ou hidrogenofosfato de cálcio di-hidratado (DCPD), $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; (c) a monetite ou hidrogenofosfato de cálcio anidro (DCPA), CaHPO_4 ; (d) o fosfato octacálcico (OCP), $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; (e) e a whitlockite ou fosfato tricálcico (?-TCP), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [2]. Na tabela 1.1 são apresentados os principais fosfatos de cálcio presentes no corpo humano, a sua fórmula química e ocorrência.

Tabela 1.1: Principais fosfatos de cálcio existentes no corpo humano e sua ocorrência*.

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ocorrência
"Apatite"	$(\text{Ca}, \text{Z})_{10}(\text{PO}_4, \text{Y})_6(\text{OH}, \text{X})_2^a$	Esmalte dentário ^b , dentina ^b , osso ^b , cálculos renais, cálculos dentários, cálculos urinários, calcificações de tecidos moles
Fosfato octacálcico, OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Cálculos dentários e urinários
Brushite, hidrogenofosfato de cálcio di-hidratado, DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cálculos dentários, ossos em decomposição
Whitlockite, fosfato tricálcico, ?-TCP	$(\text{Ca}, \text{Mg})_9(\text{PO}_4)_6$	Cálculos dentários e urinários, cáries dentárias, cartilagem com artrite, calcificações de tecidos moles
Fosfato de cálcio amorfo, ACP	$(\text{Ca}, \text{Mg})_?(\text{PO}_4, \text{Y}')_?$	Calcificações de tecidos moles
^a Z= Na, Mg, K, Sr, etc;	Y= CO_3 , HPO_4 ; X= F, Cl;	Y'= P_2O_7 , CO_3 .

* Adaptação da tabela 1.1, ref. [2] p.2.

^b Tecidos calcificados normais.

1.2 ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS

Sabendo que os fosfatos de cálcio constituem o maior grupo de biominerais presente nos animais vertebrados e dado que, nos sistemas biológicos, os processos de mineralização e desmineralização se apresentam particularmente importantes (estando intimamente relacionados a prevenção e tratamento das mineralizações de origem patológica, com a formação óssea e a própria desmineralização dos tecidos calcificados), torna-se fundamental estudar e compreender a formação e as transformações sofridas *in vitro* por estes materiais. A compreensão da formação e transformação dos diferentes fosfatos de cálcio em sistemas bem definidos, poderá ajudar a clarificar processos similares *in vivo*.

Dois dos parâmetros experimentais considerados bastante importantes para a descrição dos processos de calcificação *in vitro*, e que nunca deverão ser esquecidos no estudo destes processos biológicos, são o pH e a temperatura (quando estudados em condições com interesse biológico ou seja, semelhantes às existentes no plasma humano) [6, 7].

De entre os fosfatos de cálcio apresentados na tabela 1.1, são as apatites que se apresentam como fase mais estável e poderão ser consideradas como produto final (provável) em muitas das reacções de transformação destes materiais. Em solução, quase todos os fosfatos de cálcio se convertem, com ou sem formação de fases intermediárias, em produtos apatíticos [3]. Este facto, aliado à capacidade de incorporar diferentes iões na sua estrutura confere uma enorme importância às apatites. As propriedades físico-químicas dos materiais apatíticos estão associadas à natureza, extensão e localização reticular dos átomos substituintes [3-5].

Assim sendo, o estudo pormenorizado da posição dos átomos constituintes na rede destes biomateriais contribuirá para uma melhor compreensão das suas principais características [3]. As apatites biológicas, por exemplo, são

caracterizadas por apresentarem um elevado número de imperfeições estruturais do tipo lacunas e substituições atômicas por outros íons tais como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , F^- , Cl^- , CO_3^{2-} , entre outros. A quantidade de impurezas e defeitos presentes na estrutura das apatites é superior à encontrada na estrutura de outros fosfatos de cálcio [2-4].

Tendo em consideração tudo o que foi anteriormente referido, e para que se compreendam melhor os processos de integração e reconstituição óssea pretendeu-se, numa fase inicial deste trabalho, estudar as possíveis influências da composição inicial do meio e da temperatura na estrutura, morfologia e composição de alguns dos fosfatos de cálcio biologicamente relevantes. Deste modo realizou-se a síntese, a partir de soluções sobressaturadas em Ca^{2+} e HPO_4^{2-} (em relação à hidroxiapatite) de diferentes fosfatos de cálcio na presença e ausência de alguns íons existentes no plasma humano (Na^+ , K^+ , Cl^- e CO_3^{2-}), a temperatura (37 e 45 ± 1 °C) e pH ($5,00$ a $9,00 \pm 0,05$) constantes, dentro de intervalos correspondentes a condições locais verificáveis nos afastamentos à homeostasia.

Posteriormente, alguns dos sólidos inicialmente sintetizados foram imersos numa solução de um fluido fisiológico simulado (SBF), a 37 °C, com um pH inicial de $7,40 \pm 0,05$ e deixados a envelhecer durante diferentes períodos de tempo. Estas experiências de envelhecimento visavam sobretudo uma compreensão das possíveis transformações sofridas por cada um dos fosfatos de cálcio sintetizados (DCPD, OCP e HA), nos sistemas biológicos e em condições homeostáticas.

1.3 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação encontra-se estruturada da seguinte forma:

No capítulo 1 foi feita uma breve introdução ao tema desta dissertação. Deste modo, apresentaram-se inicialmente algumas considerações gerais sobre os fosfatos de cálcio biologicamente relevantes, em particular sobre a hidroxiapatite. De seguida, para além do enquadramento e dos objectivos do trabalho realizado é referido o modo de organização desta mesma dissertação.

No capítulo 2 é apresentada uma revisão dos aspectos mais importantes de alguns dos fosfatos de cálcio biologicamente relevantes (ACP, DCPA, DCPD, OCP, TCP e HA). Inicialmente, descrevem-se as principais características de cada uma destas fases de fosfato, nomeadamente a sua ocorrência, estrutura cristalina, morfologia, importância biológica e comportamento térmico. Sempre que possível, também são apresentados os espectros de difracção de raios X (DRX) e de absorção no infravermelho (FTIR) de cada um dos fosfatos de cálcio em estudo, dado que estas foram as técnicas mais usadas para a identificação e caracterização dos sólidos obtidos experimentalmente.

Neste capítulo ainda se faz referência à importância do estudo do processo de envelhecimento *in vitro* dos fosfatos de cálcio e apresentam-se as transformações (mais) prováveis dos materiais sintetizados.

No capítulo 3 apresentam-se os métodos e as técnicas experimentais de análise usadas ao longo de todo o trabalho experimental, quer na síntese e caracterização das diferentes fases de fosfato obtidas, quer no decorrer das experiências de envelhecimento de alguns destes sólidos, em SBF. Neste capítulo

também são apresentadas (de forma resumida) as principais características dos diferentes instrumentos utilizados na caracterização de todos os fosfatos de cálcio obtidos.

No capítulo 4 descrevem-se as condições experimentais e o método de síntese adoptado. No entanto, o principal objectivo deste capítulo é apresentar e discutir os diferentes resultados obtidos (para cada uma das condições experimentais em estudo).

No capítulo 5 são descritas as experiências de envelhecimento realizadas e, tal como no capítulo anterior, são apresentados e discutidos os resultados obtidos experimentalmente.

Finalmente no capítulo 6, são enumerados alguns aspectos que poderão ser objecto de trabalho futuro.

2. ASPECTOS IMPORTANTES DE ALGUNS FOSFATOS DE CÁLCIO BIOLOGICAMENTE RELEVANTES

2.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento de trabalhos dedicados ao estudo da formação [11, 21-28, 31-55] e das transformações [4, 7, 56-65] *in vitro* de alguns fosfatos de cálcio biologicamente relevantes (ACP, DCPD, DCPA, OCP, β -TCP, HA). O estudo *in vitro* destes materiais tem-se revelado extremamente importante, dado que poderá permitir conhecer e fundamentalmente compreender os factores que influenciam a sua formação e/ou transformação *in vivo*.

2.1.1 Considerações termodinâmicas importantes

Os diagramas de fase, são extremamente úteis para prever a fase de fosfato de cálcio mais estável, em solução, com condições específicas de temperatura, pressão, pH e grau de saturação em relação aos iões cálcio e fosfato inorgânico total (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}). Por exemplo, a partir do diagrama apresentado na figura 2.1 poder-se-á prever que a fase de fosfato de cálcio mais estável nas condições padrão, à temperatura ambiente (25 °C), pH 6 e para uma concentração Ca^{2+} de 10^{-2}M , seja o DCPD; para diferentes condições de pH, concentrações de Ca e fosfato inorgânico serão mais estáveis outras fases.

No entanto, este tipo de diagramas não têm em consideração outros factores que poderão afectar a fase de fosfato obtida. Por exemplo, a presença de outros iões em solução (para além do cálcio e fósforo), da velocidade de adição dos reagentes [26, 28] ou da velocidade de agitação da solução poderão afectar o tipo de fase que se forma.

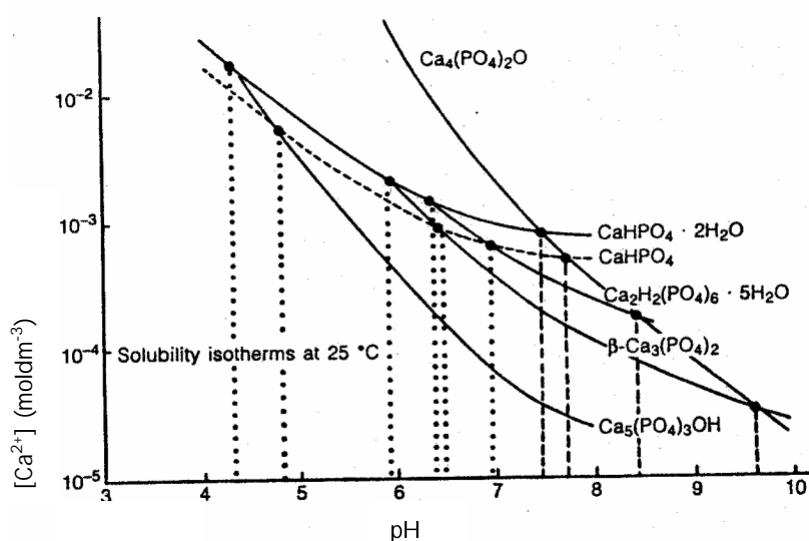


Figura 2.1: Diagrama de solubilidade de fases para o sistema: $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ a 25 °C, mostrando a fase de fosfato de cálcio mais estável para diferentes valores de pH e diferentes concentrações do ião cálcio [2].

Assim sendo, a formação *in vitro* dos diferentes fosfatos de cálcio, tem sido estudada para um variado número de sistemas e condições. Nos vários sistemas estudados estão incluídos: soluções aquosas [21, 23-25, 31-33, 37, 42, 51, 54] e não - aquosas [22, 33, 36, 46]; fluidos biológicos (saliva, urina); fluidos biológicos sintéticos [48], sistemas gel inorgânicos (sílica) ou orgânicos (agar e colagénio) [38]; membranas selectivas de iões [27]; liposomas. As diferentes condições incluem: variação de pH [21, 22, 24, 32, 44, 45, 49] e temperatura [28, 43]; diferentes níveis de saturação; presença de iões/moléculas inorgânicas (p. ex.

F⁻, Cl⁻, CO₃²⁻, P₂O₇⁴⁻, K⁺, Na⁺, Mg²⁺, etc.) [26, 34, 35, 39, 40, 55] ou orgânicas (íões citrato, lípidos, proteínas existentes na saliva e outras proteínas simples ou complexas) [11, 27, 50].

2.2 FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO (ACP)

2.2.1 Ocorrência e importância biológica

Pensa-se que o ACP seja um constituinte mineral do osso. Este fosfato transformar-se-á no osso em apatite, actuando assim como fase precursora das apatites biológicas [2, 5].

Foi demonstrado experimentalmente, por difracção de raios X (DRX) e espectroscopia de infravermelho (IV), que a fase mineral do osso é formada por uma mistura de dois fosfatos de cálcio. Esta mistura é formada por um componente amorfo e por um outro componente pouco cristalino que se assemelha à hidroxiapatite. Estes estudos mostraram que a percentagem do componente amorfo diminui com o envelhecimento do animal. Em média, num osso jovem existirá cerca de 65% da fase amorfa e num osso maduro cerca de 35% [8].

O ACP é estável em tecidos não humanos e em calcificações patológicas de tecidos humanos [2, 5, 8]. O ACP presente nas calcificações patológicas contém magnésio, carbonato e pirofosfato [15] enquanto que o ACP que actua como fase precursora das apatites biológicas e sintéticas não apresenta substituições [16].

2.2.2 Morfologia

A observação do ACP por microscopia electrónica mostra a existência de partículas de forma esférica com diâmetros compreendidos entre os 20 e 120 nm [5].

2.2.3 Espectros de raios-X e de infravermelho

O facto de este material ser amorfo torna a sua caracterização bastante difícil. Neste caso a técnica de DRX não é útil, podendo no entanto usar-se a espectroscopia de infravermelho para obter informação sobre a presença de outros grupos, para além dos pertencentes à HA, tais como o carbonato e o pirofosfato [2, 8].

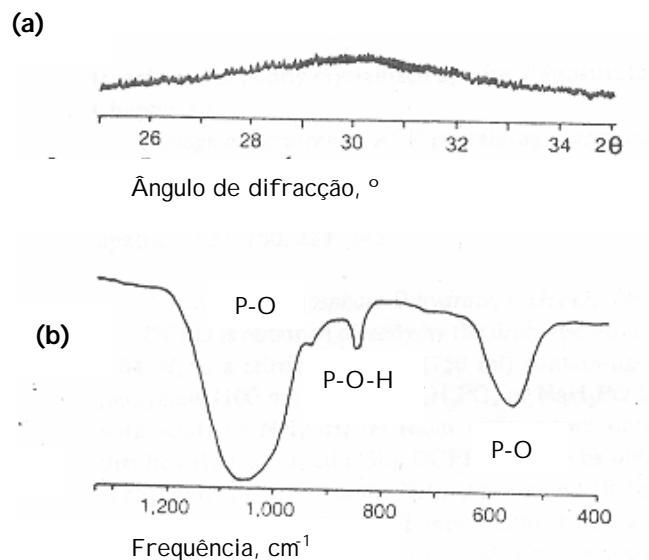


Figura 2.2: (a) Difractograma de pós atribuído ao ACP não substituído, onde é visível a ausência de picos de difracção, característica de materiais amorfos; (b) Espectro de infravermelho característico do ACP sem substituições [2].

O ACP constituído apenas por cálcio e fosfato (sem substituições iónicas) tem uma relação molar Ca/P de cerca de 1,50 e apresenta um difractograma de pó idêntico ao da figura 2.2(a) [2]. O ACP não substituído também é caracterizado por um espectro de infravermelho com bandas de absorção de baixa resolução, atribuídas aos grupos PO_4 e HPO_4 - figura 2.2(b) [2, 5].

2.3 HIDROGENOFOSFATO DE CÁLCIO ANIDRO (DCPA), MONETITE

2.3.1 Origem e ocorrência

O mineral, monetite, foi descrito pela primeira vez em 1882 em depósitos de fosfatos rochosos nas ilhas de Moneta (de onde deriva o seu nome) e de Mona nas Índias Ocidentais [17].

O DCPA, CaHPO_4 , parece não ocorrer em cálculos dentários ou noutras calcificações de origem patológica, nem foi encontrado em calcificações normais. No entanto, o DCPA foi observado em calosidades de fracturas [5].

A formação do DCPD em vez do DCPA, a fase termodinamicamente mais estável, nos sistemas biológicos e mesmo *in vitro*, pode ser explicada através da baixa velocidade de crescimento dos cristais de DCPA relativamente aos de DCPD. Elliot [5] e Matthews, *et al* [6] sugerem que o DCPD cristaliza primeiro que o sal anidro menos solúvel porque os iões hidratados na solução seriam incorporados mais facilmente num cristal hidratado e, também, devido ao facto de uma estrutura hidratada ter uma energia superficial menor na fase de nucleação, que seria favorecida termodinamicamente sobre os núcleos cristalinos anidros.

2.3.2 Estrutura cristalina

À temperatura ambiente (25 °C), o DCPA apresenta uma estrutura triclinica pertencente ao grupo espacial $P\bar{1}$ com os seguintes parâmetros de rede $a = 6,910(1) \text{ \AA}$, $b = 6,627(2) \text{ \AA}$, $c = 6,998(2) \text{ \AA}$; $\alpha = 96,34(2)^\circ$, $\beta = 103,82(2)^\circ$ e $\gamma = 88,33(2)^\circ$. Cada célula unitária de DCPA contém quatro unidades de íons cálcio e fosfato ligados entre si, figura 2.3 [3, 5].

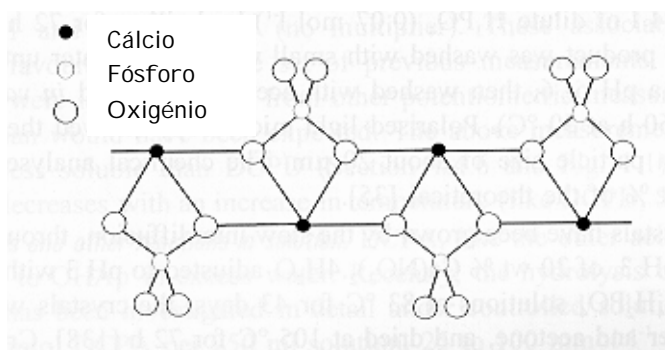


Figura 2.3: Cadeia de íons cálcio e fosfato que forma a unidade básica da estrutura do DCPA [5].

As cadeias de $\cdots \text{Ca PO}_4 \text{ Ca PO}_4 \text{ Ca PO}_4 \text{ Ca PO}_4 \cdots$, representadas na figura 2.3, estendem-se ao longo do eixo a e estão unidas entre si, na direcção do eixo b , por ligações do tipo Ca-O formando camadas distorcidas de átomos localizados (aproximadamente) no plano (001); o centro de simetria produz outra camada localizada imediatamente abaixo, segundo a direcção do eixo c [5].

Deste modo, a estrutura do DCPA consiste fundamentalmente numa rede tri-dimensional de fosfatos tetraédricos unidos entre si por íons Ca^{2+} (localizados nos interstícios) [2, 5, 6].

2.3.3 Espectro de DRX atribuído ao DCPA puro

O DCPA puro apresenta uma relação molar Ca/P de aproximadamente 1,00 e o seu espectro de DRX, com os picos mais característicos, é apresentado na figura 2.4 [2].

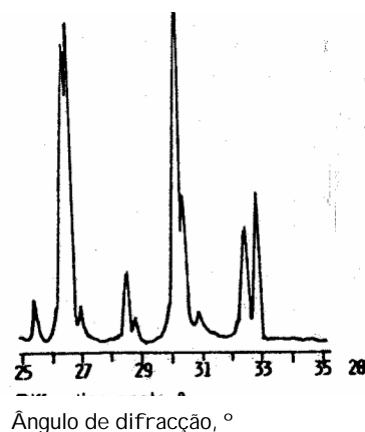


Figura 2.4: Espectro de DRX característico da monetite (DCPA) [2].

2.4 FOSFATO DE CÁLCIO DI-HIDRATADO (DCPD), BRUSHITE

2.4.1 Ocorrência e importância biológica

O DCPD de fórmula química $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, vulgarmente designado por brushite, surge em pequenas quantidades como um dos componentes de depósitos de fosfatos rochosos e em incrustações de ossos humanos antigos [18], em cálculos dentários [19] e em outros tipos de calcificações patológicas [20].

O DCPD pode ocorrer como uma fase intermediária durante a precipitação da HA. Este fosfato de cálcio tem sido proposto como um intermediário na mineralização apatítica e em processos de dissolução (mineralização óssea; dissolução do esmalte dentário em meio ácido; durante o tratamento dentário com administração de fluoreto) [5].

O próprio mecanismo de formação do osso, estabelece geralmente, o aparecimento de DCPD como fase precursora de HA o que implica que localmente, pelo menos, o pH deva ser inferior ao valor homeostático. Também durante o processo pós-cirúrgico, resultante de uma implantação óssea, o pH e temperatura locais podem divergir dos valores homeostáticos (pH=7,4 e T=37 °C) [78].

2.4.2 Estrutura cristalina e morfologia

Os cristais de DCPD apresentam, normalmente, uma morfologia do tipo placa (que pode ser alterada na presença de impurezas, como p. ex., o ião pirofosfato, zinco, etc.) [2] e têm uma estrutura monoclinica pertencente ao grupo espacial *Ia* com os seguintes parâmetros de rede $a = 5,812 \pm 0,002 \text{ \AA}$, $b = 15,180 \pm 0,003 \text{ \AA}$, $c = 6,239 \pm 0,002 \text{ \AA}$ e $\beta = 116^\circ 25 \pm 2'$ [3, 5].

Tal como o DCPA, também o DCPD pertence ao grupo de cristais que contêm na sua estrutura uma camada distorcida formada por cadeias de $\cdots \text{Ca PO}_4 \text{ Ca PO}_4 \text{ Ca PO}_4 \text{ Ca PO}_4 \cdots$, orientadas paralelamente entre si (figura .2.5) [2, 3, 5, 6].

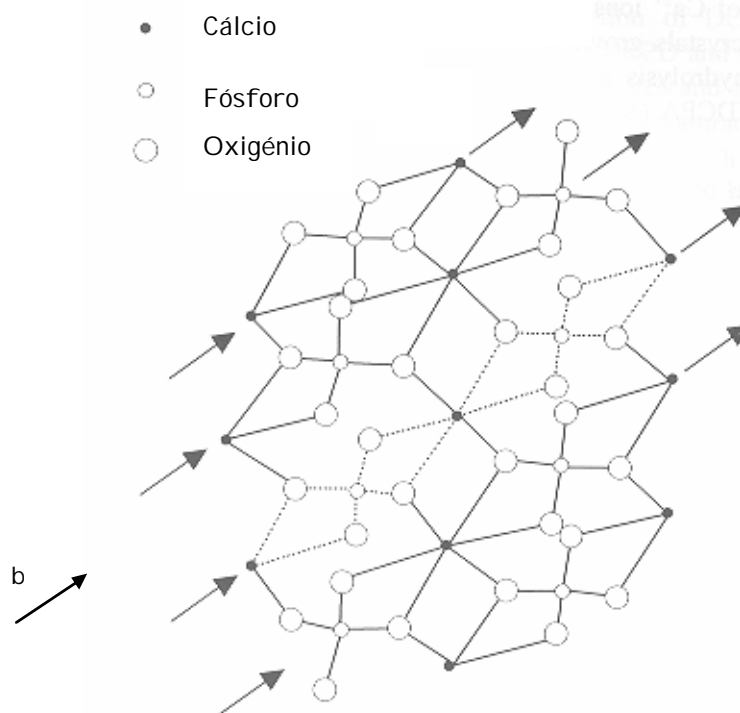
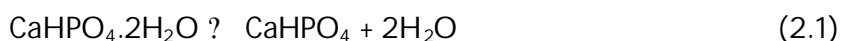


Figura 2.5: Representação, segundo a direcção do eixo b , de uma das camadas distorcidas, compostas por unidades de CaHPO_4 características da estrutura cristalina apresentada pelo DCPD. Existem quatro cadeias do tipo $\cdots \text{Ca PO}_4 \text{ Ca PO}_4 \text{ Ca PO}_4 \text{ Ca PO}_4 \cdots$, orientadas na direcção assinalada pela setas, e estão também representadas (a tracejado) as ligações entre as unidades de CaHPO_4 . As camadas são todas paralelas ao plano (100) e estão ligadas entre si por moléculas de água. Para simplificar a interpretação deste tipo de estrutura não estão representadas as moléculas de água nem os hidrogénios dos grupos fosfato [5].

2.4.3 Decomposição térmica

À temperatura ambiente o DCPD perde lentamente a água de cristalização, mas o processo de desidratação depende da quantidade de imperfeições presentes no cristal. A desidratação do DCPD a DCPA (equação 2.1) é catalisada pela água e em ambientes húmidos prossegue por intermédio de uma única reacção até 135 °C; na ausência de humidade dá-se por etapas, incluindo a formação de uma fase amorfa que persiste acima de 530 °C [5].



Quando o DCPD é aquecido a 180 °C também se observa formação de DCPA. Continuando o aquecimento obtém-se, entre os 320 e 340 °C, β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ proveniente da seguinte reacção de condensação:



Aumentando a temperatura até cerca de 700 °C é obtida a forma β que, por volta dos 1200 °C, se transforma em γ - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$. [2, 5].

2.4.4 Espectros de raios-X e infravermelho

O DCPD puro é caracterizado por um difractograma de pós e espectro de infravermelho como os apresentados na figura 2.6(a) e (b); e uma relação molar Ca/P de 1,00 [2].

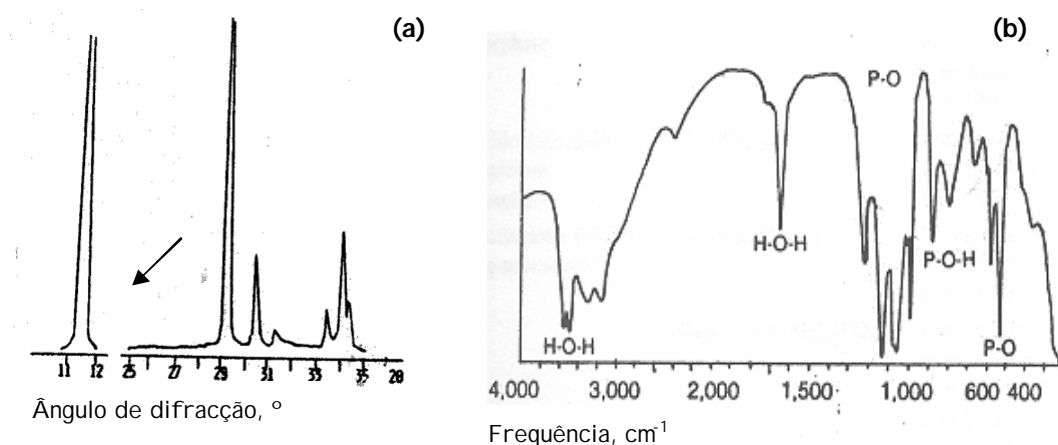


Figura 2.6: (a) Espectro de DRX atribuído ao DCPD puro. O pico de maior intensidade surge para 11,7° (2?); (b) Espectro de infravermelho característico do DCPD, onde são visíveis as bandas de absorção atribuídas às ligações O-H (H₂O), P-O-H (HPO₄) e P-O (PO₄) [2].

2.5 FOSFATO OCTACÁLCICO (OCP)

2.5.1 Origem, ocorrência e importância biológica

O fosfato octacálcico tem a fórmula $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ainda que o conteúdo em água seja um tanto variável. Segundo Bjerrum, um fosfato de cálcio com a composição do OCP foi pela primeira vez descrito por Berzelius em 1836. Contudo, a sua existência não foi universalmente aceite até meados do século XX, e a sua importância não foi reconhecida até fins da década de 50 início dos anos 60, desse mesmo século [5].

O OCP tem sido referido como fase precursora na precipitação da HA, termodinamicamente mais estável, e das apatites biológicas porque o OCP nucleia e cresce mais facilmente que a HA [25]. Perceber o crescimento do OCP [21, 22, 26, 28] e a sua hidrólise [4] será fundamental para esclarecer os processos de

mineralização dos dentes e ossos, e de remineralização das cáries dentárias [27]. A semelhança estrutural entre o OCP e a HA tem sido muitas vezes usada para explicar a incorporação (via hidrólise) de impurezas, particularmente os iões CO_3^{2-} , Mg^{2+} , F^- , K^+ e Na^+ [4], e a não-estequiometria dos fosfatos de cálcio apatíticos obtidos por precipitação [23, 24].

Para além da importante função que desempenha na cinética de formação e na composição das apatites, o OCP tem sido encontrado como um dos constituintes de alguns cálculos dentários e outras calcificações patológicas [2, 5, 6].

2.5.2 Estrutura cristalina

A estrutura cristalina do OCP, inicialmente determinada por Brown em 1962, tem vindo a ser refinada. O OCP apresenta uma estrutura triclinica, pertencendo ao grupo espacial $P\bar{1}$ com os seguintes parâmetros de rede $a = 19,692(4) \text{ \AA}$, $b = 9,523(2) \text{ \AA}$, $c = 6,835(2) \text{ \AA}$ e $\alpha = 90,15(2)^\circ$, $\beta = 92,54(2)^\circ$ e $\gamma = 108,65(1)^\circ$ [3, 5].

A unidade assimétrica (a maior unidade estrutural na qual nenhum dos átomos está relacionado por simetria) é $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, com duas unidades assimétricas por célula unitária. As camadas "apatíticas" (com cerca de 1,10 nm de espessura) alternando com as camadas de "água" ou "hidratadas" (cerca de 0,80 nm de espessura) paralelas ao plano (100) são uma das particularidades desta estrutura - figura 2.7. A semelhança entre os parâmetros de rede do OCP e os da HA ($a = 9,432 \text{ \AA}$ e $c = 6,881 \text{ \AA}$), é explicada pela presença da camada "apatítica". Esta camada, é formada por camadas de iões fosfato intercaladas por iões Ca^{2+} ; e

as camadas de "água" são constituídas por íons fosfato e Ca^{2+} mais espaçados e com um número (ligeiramente) variável de moléculas de água entre ambos. Seis dos íons Ca^{2+} e dois dos íons fosfato encontram-se na camada "apatítica". Os outros dois íons Ca^{2+} e um íon fosfato estão na camada de "água". Os restantes três íons fosfato permanecem na junção das camadas "apatíticas" e "água". O íon fosfato situado na camada de "água" e um outro, localizado na junção entre camadas, encontram-se protonados [5].

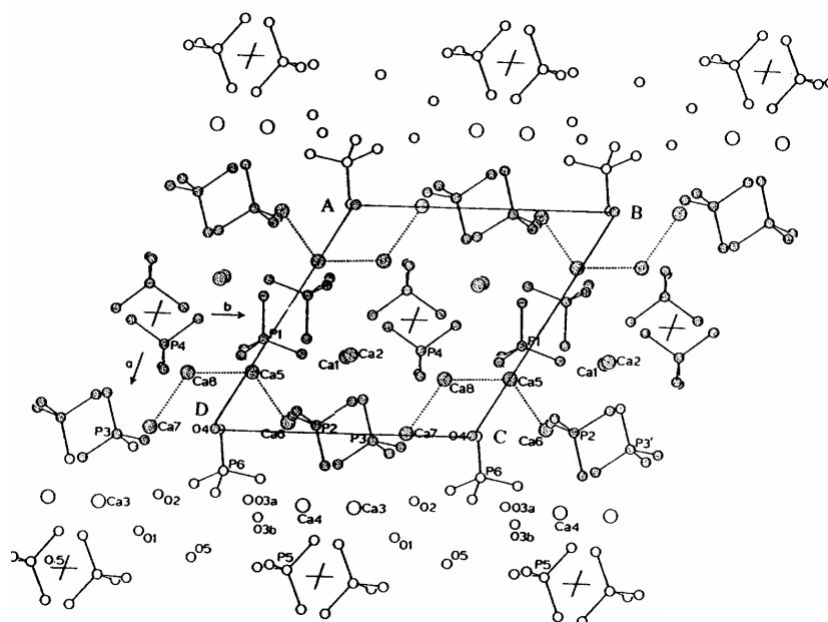


Figura 2.7: Representação da célula unitária do OCP mostrando, na região central, a camada "apatítica" [3].

2.5.3 Comportamento térmico

A decomposição térmica do OCP foi acompanhada por espectrometria de massa [80] e retiraram-se as seguintes conclusões: o pico mais largo, obtido perto dos 200 °C, foi atribuído ao desaparecimento da estrutura do OCP, acompanhado

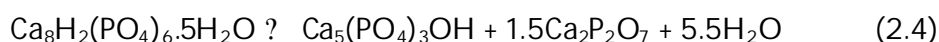
por uma grande perda de água e aumento das concentrações dos iões OH^- e HPO_4^{2-} , determinado por I.V. Próximo dos 500 °C, a concentração do pirofosfato atinge um máximo e por volta dos 700 °C, é observado um outro pico que corresponde à perda de OH^- e $\text{P}_2\text{O}_7^{2-}$.

O aquecimento do OCP até uma temperatura de aproximadamente 100 °C provoca uma perda parcial da água de hidratação. Nestas condições as moléculas de água perdidas não são águas de cristalização “verdadeiras”, são água que se encontra adsorvida na estrutura do OCP [5]. A água de cristalização libertar-se-á perto dos 200 °C.

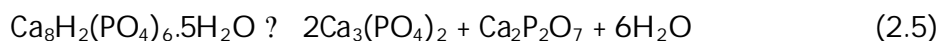
A perda de água inicial do OCP, anteriormente referida, é traduzida pela equação:



Segundo Fowler *et al.* [79], entre os 300 e 400°C, dá-se a formação de β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, segundo a reacção:



Acima dos 700°C forma-se β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, de acordo com a seguinte equação geral:



2.5.4 Espectros de raios-X e infravermelho característicos

O OCP puro é caracterizado pelos espectros de raios-X e de infravermelho apresentados na figura 2.8(a) e (b); uma relação molar Ca/P de 1,33 e por uma morfologia esferolítica (as esferolites observadas são formadas por cristais de formas aciculares ou placas finas) [2].

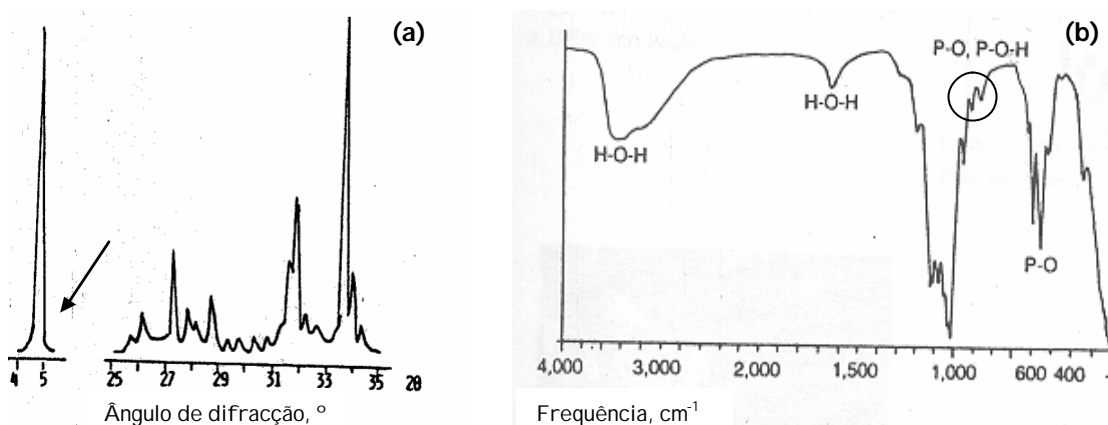


Figura 2.8: (a) Espectro de DRX característico do OCP; (b) Espectro de infravermelho característico do OCP onde são visíveis as bandas de absorção atribuídas ao grupo HPO_4^{2-} a 865 e 910 cm^{-1} , ambas características do OCP e que podem ser usadas para detectar a sua presença em misturas de OCP e HA [2].

2.6 FOSFATO TRICÁLCICO (β -TCP), WHITLOCKITE

2.6.1 Ocorrência e importância biológica

A whitlockite pura (β -TCP), $(\text{Ca})_3(\text{PO}_4)_2$, não se encontra em sistemas biológicos, nem pode ser preparada a partir de sistemas aquosos [2]. Este fosfato

de cálcio pode apenas ser obtido a temperaturas elevadas (900 °C), por reacções no estado sólido [8].

A presença de iões como o Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} dá origem a whitlockites substituídas. As whitlockites biológicas contêm normalmente magnésio na sua estrutura, $(Ca, Mg)_3(PO_4)_2$, e, por isso, designam-se β -TCMP [2, 3]. A presença do ião magnésio, em sistemas biológicos ou mesmo em sistemas sintéticos, permite a formação de β -TCP a baixas temperaturas (37 a 100 °C). A presença deste ião permite também a formação desta mesma fase a partir de sistemas aquosos [2, 5, 8].

Não foram detectadas whitlockites como constituintes dos tecidos calcificados normais [2, 8]. No entanto, detectou-se a sua presença em alguns tecidos calcificados de origem patológica e em cáries dentárias humanas [11].

2.6.2 Espectro de raios-X e estrutura cristalina

O β -TCP puro é caracterizado pelo espectro de DRX apresentado na figura 2.9, uma relação molar Ca/P de 1,50 [2] e por apresentar cristais com uma estrutura romboédrica [5] pertencendo ao grupo espacial $R3c$ com os seguintes parâmetros de rede $a = 10,439(1)$ Å e $c = 37,375(6)$ Å [3].

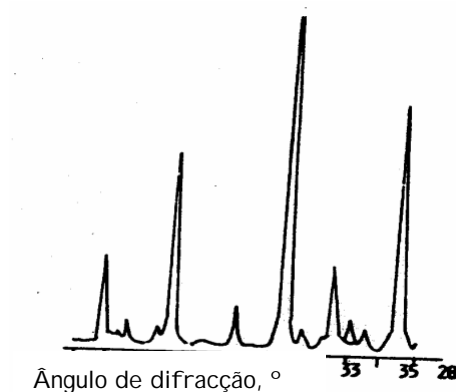


Figura 2.9: Espectro de DRX característico do β -TCP puro [2].

2.7 HIDROXIAPATITE E OUTRAS APATITES

2.7.1 Apatites biológicas

Apesar das apatites biológicas terem vindo a ser idealizadas como hidroxiapatite, existem diferenças na composição e noutras propriedades que tornam estas fases de fosfato não apenas diferentes da própria hidroxiapatite, como também diferentes entre si (tabela 2.1).

Tabela 2.1: Comparação da composição química e das propriedades físicas da fase inorgânica que constitui o esmalte dentário, dentina e osso humano (adulto)*.

	Esmalte	Dentina	Osso
Composição ^{a)}			
Cálcio, Ca ²⁺	36,5	35,1	34,8
Fósforo, P	17,7	16,9	15,2
(Ca/P) molar	1,63	1,61	1,71
Sódio, Na ⁺	0,5	0,6	0,9
Magnésio, Mg ²⁺	0,44	1,23	0,72
Potássio, K ⁺	0,08	0,05	0,03
Carbonato, CO ₃ ²⁻	3,5	5,6	7,4
Fluoreto, F ⁻	0,01	0,06	0,03
Cloreto, Cl ⁻	0,30	0,01	0,13
Pirofosfato, P ₂ O ₇ ⁴⁻	0,02	0,10	0,07
Propriedades cristalográficas			
Parâmetros de rede (±0,003 Å)			
eixo – a	9,441	9,419	9,417
eixo – c	6,880	6,880	6,890
Tamanho dos cristalitos, Å	1,300 x 300	200 x 40	250 x 30

^{a)} Composição expressa em % (m/m).
Adaptação da tabela 6.1, ref. [2] p.110.

Apesar de serem conhecidas muitas das principais propriedades físico-químicas deste tipo de apatites, continuam a ser realizados estudos acerca da composição e estrutura destas fases contendo fosfato [12, 13, 35, 41, 55]. O facto de as apatites biológicas serem microcristalinas; com composição variável; não estequiométricas ($1,50 \leq \text{Ca/P} \leq 1,75$); apresentarem coexistência ou pré-existência de possíveis precursores como ACP, DCPD, OCP, TCP; e poderem apresentar superficialmente, ou incorporados na própria estrutura, iões inorgânicos como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , F^- , Cl^- , HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , etc, torna extremamente difícil a sua caracterização [2, 5, 6]. Este conjunto de factores, em particular as substituições iónicas, influencia consideravelmente as propriedades físico-químicas destes biominerais e, consequentemente, os processos de mineralização e desmineralização dos tecidos calcificados [10].

2.7.2 Apatites sintéticas

2.7.2.1 Estrutura da fluoroapatite, da cloroapatite e da hidroxiapatite

A fluoroapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, é o membro mais conhecido e mais estável da família das apatites. A FAP apresenta uma estrutura hexagonal, pertencendo ao grupo espacial $P6_3/m$, com os seguintes parâmetros de rede $a = 9,367(1) \text{ \AA}$ e $c = 6,884(1) \text{ \AA}$ [3, 5].

Tal como a FAP, também a hidroxiapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e a cloroapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$, apresentam uma estrutura hexagonal, pertencendo ao grupo espacial $P6_3/m$, com os respectivos parâmetros de rede $a = b = 9,432 \text{ \AA}$ e $c = 6,881 \text{ \AA}$; $a = b = 9,598(2) \text{ \AA}$ e $c = 6,776(4) \text{ \AA}$ [3]. No entanto, a HA e a CIAP estequiométricas apresentam uma estrutura monoclinica, pertencendo ao grupo espacial $P2_1/b$, com os respectivos parâmetros de rede $a = 9,4214(8) \text{ \AA}$, $b = 2a$, e $c = 6,8814(7) \text{ \AA}$, $\beta = 120^\circ$; $a = 9,628(5) \text{ \AA}$, $b = 2a$ e $c = 6,764(5) \text{ \AA}$, $\beta = 120^\circ$ [3, 5].

Uma vez que a hidroxiapatite estequiométrica não ocorre nos sistemas biológicos [2, 3], e dado que as hidroxiapatites sintetizadas (no decorrer do trabalho experimental) apresentam uma estrutura hexagonal será dada particular atenção a este tipo de estrutura.

2.7.2.2 Célula unitária da estrutura hexagonal da hidroxiapatite

A estrutura da HA, mostrando as posições atômicas exactas no cristal foi determinada por Beevers e McIntyre a partir de um mineral [29] e mais tarde, refinada por Kay et al.[30] a partir de uma HA sintética.

A figura 2.10 apresenta a célula unitária da estrutura hexagonal da hidroxiapatite. Poder-se-á verificar que existem duas posições distintas para o cálcio, uma delas designada por Ca(1) - ocorre em colunas paralelas ao eixo c - a outra ocorre em triângulos equiláteros centrados nos vértices da célula unitária, denominada por Ca(2). Dos dez iões cálcio que compõem a célula unitária, seis localizam-se na posição Ca(2) e quatro ocupam a posição Ca(1). Cada átomo de Ca(2) está rodeado por seis átomos de oxigénio (dos grupos PO_4 e OH), enquanto que cada um dos outros quatro iões cálcio encontram-se rodeados por seis átomos de oxigénio dos grupos fosfato. A rede de grupos PO_4 estabelece a organização do esqueleto da estrutura apatítica [3, 10].

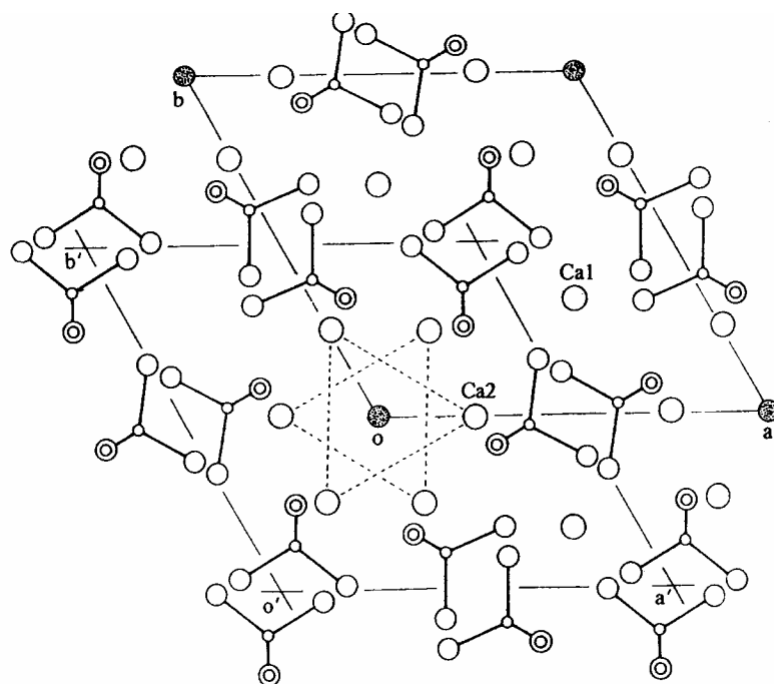


Figura 2.10: Célula unitária da HA hexagonal, projectada ao longo do eixo *c*. Os vértices da célula unitária (representados pelos círculos a cheio) estão ocupados pelos iões OH^- [3].

2.7.2.3. Espectros de raios-X e de infravermelho característicos da HA

As hidroxiapatites obtidas, por precipitação ou hidrólise, a partir de sistemas aquosos são: a) não estequiométricas (relação molar Ca/P mais baixa que o valor da HA pura – 1,67); b) têm o parâmetro de rede *a* maior do que o da HA mineral e apatites estequiométricas obtidas a temperaturas superiores a 800 °C; c) apresentam, nos espectros de infravermelho, as bandas de absorção atribuídas ao grupo HPO_4^{2-} ; d) e dão origem à formação de β -TCP e HA, após tratamento térmico a 700 °C [2].

A HA não estequiométrica precipitada a uma temperatura de 95 °C e pH (inicial) 7,5 apresenta um difractograma de pós como o da figura 2.11. Na figura 2.12 são apresentados os espectros de infravermelho de HA obtida (por precipitação) a diferentes temperaturas [2].

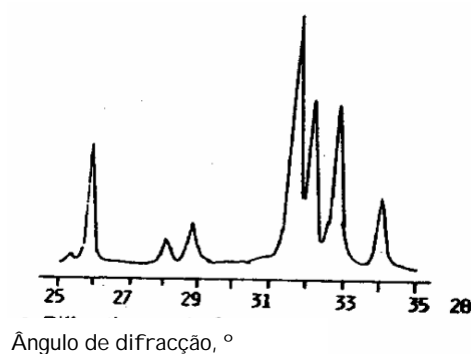


Figura 2.11: Espectro de DRX característico da HA não estequiométrica sintetizada a pH 7,5 e 95 °C [2].

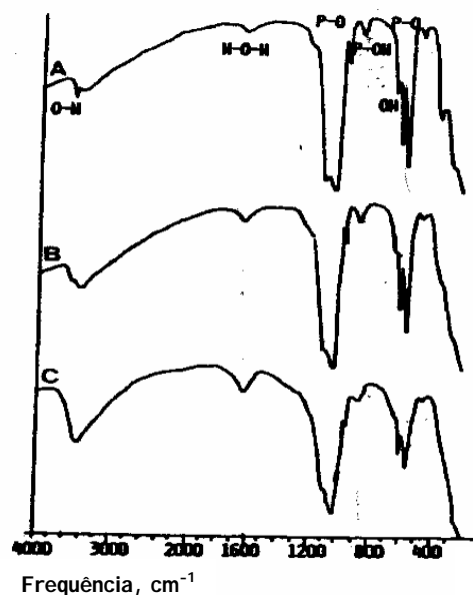


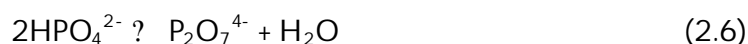
Figura 2.12: Espectros de infravermelho da HA não estequiométrica obtida por precipitação a diferentes temperaturas: (a) 45 °C; (b) 80 °C; (c) 100 °C [2].

2.7.2.4 Comportamento térmico da hidroxiapatite

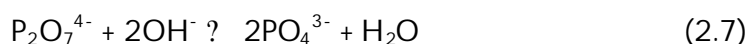
De um modo geral, o aquecimento de apatite até cerca de 200 °C dá origem à libertação de moléculas de água adsorvida e água intersticial. No caso particular da HA a perda de massa observada, para esta gama de temperatura, corresponde à saída de moléculas de água adsorvidas [5].

Segundo C. Rey *et al* [37] nas HA's não estequiométricas podem ocorrer, para temperaturas superiores a 200 °C, várias reacções intracristalinas envolvendo espécies termicamente instáveis (tais como HPO_4^{2-} e CO_3^{2-}).

Se existirem iões HPO_4^{2-} ocorre, entre os 250 e 600 °C, a primeira reacção intracristalina (a condensação do hidrogenofosfato):



Os iões $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ permanecem na estrutura apatítica de uma forma bastante distorcida, e por volta dos 700 °C reagem com os iões OH^- da HAP:



regenerando os grupos PO_4^{3-} . Se existir um excesso de iões pirofosfato formar-se-á uma fase separada de $\gamma\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

Quando as HA's contêm iões CO_3^{2-} como substituintes (na posição) dos iões PO_4^{3-} , designadas por HA's carbonatadas do tipo-B (secção 2.7.3.2), a decomposição dos grupos carbonato inicia-se por volta dos 600 °C.

2.7.3 Apatites substituídas. Efeito de alguns iões substituintes

2.7.3.1 Introdução

Como tem vindo a ser referido, a estrutura apatítica permite facilmente a substituição dos iões presentes na rede por outros [33, 34, 39, 40, 43-47, 49, 55].

Estas substituições, conduzem a alterações nas principais propriedades destes biomateriais (p. ex.: parâmetros de rede, cristalinidade (tabela 2.2), morfologia e solubilidade) .

Tabela 2.2: Efeito qualitativo de alguns dos iões substituintes nos parâmetros de rede e cristalinidade das hidroxiapatites sintéticas*.

Ião substituinte	Parâmetros de rede (+0,003Å)		Cristalinidade
	a	c	
Para o cálcio, Ca^{2+}	9,443	6,882	
Sr^{2+}	(+)	(+)	(na)
Ba^{2+}	(+)	(+)	(-)
Pb^{2+}	(+)	(+)	(-)
K^{+}	(+)	(na)	(na)
Na^{+}	(na)	(na)	(na)
Mg^{2+}	(-)	(-)	(-)
Cd^{2+}	(-)	(-)	(-)
Mn^{2+}	(-)	(-)	(-)
Sn^{2+}	(am)	(am)	(am)
Para o OH^{-}			
F^{-}	(-)	(na)	(+)
Cl^{-}	(+)	(-)	(na)
Para o PO_4^{3-}			
CO_3^{2-}	(-)	(+)	(-)
$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$			(-)
HPO_4^{2-}	(+)	(na)	(na)
VO_4^{3-}	(-)	(-)	(-)
$\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$			

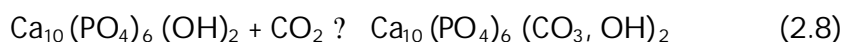
(+): aumenta; (-): decresce; (na): não altera; (am): amorfo

* Adaptação da tabela 5.1, ref. [2] p.87.

2.7.3.2 Efeito do ião CO_3^{2-} . Substituições do tipo -A e -B

As hidroxiapatites sintéticas que contêm carbonato (vulgarmente designadas por HA's carbonatadas) podem ser classificadas em dois tipos, -A ou -B, dependendo do modo de substituição do grupo CO_3^{2-} . As HA's carbonatadas que apresentam na sua estrutura os iões CO_3^{2-} na posição dos grupos OH^- , são do tipo-A. As do tipo-B, apresentam a substituição dos iões PO_4^{3-} pelos iões CO_3^{2-} [2, 5, 6, 10].

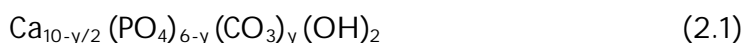
As HA's carbonatadas do tipo A são obtidas a altas temperaturas (cerca de 1000 °C) fazendo passar CO_2 sobre a HA [33, 45]:



Estas hidroxiapatites, são caracterizadas por apresentarem o parâmetro de rede *a*- maior e o *c*- menor que os da HA estequiométrica (secção 2.7.2.1) [2] e bandas de absorção de infravermelho, atribuídas ao carbonato, características deste tipo de substituição ($\sim 1545, 1450$ e 880 cm^{-1}) [5].

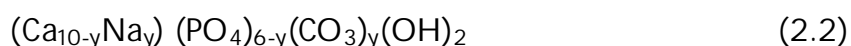
Pensa-se que uma pequena percentagem do CO_3 existente nas apatites biológicas possa estar presente como substituinte do grupo OH^- , tipo A [40].

As HA's carbonatadas do tipo B são caracterizadas por apresentarem uma substituição do CO_3 -por- PO_4 :



A extensão da incorporação de carbonato nas HA's do tipo-B é fortemente influenciada pela presença simultânea de outros iões para além do ião Ca^{2+} . Assim

sendo, é bastante comum a existência de uma substituição dupla em simultâneo: CO₃-por-PO₄ e Na-por-Ca. Neste caso, as hidroxiapatites terão a seguinte fórmula química [39, 43-45]:



As HA's carbonatadas do tipo-B, podem ser preparadas a partir de sistemas aquosos por precipitação [31, 32, 67] ou hidrólise [38, 42, 43, 48], entre 37 e 100 °C. A quantidade de CO₃²⁻ incorporado na estrutura depende da concentração em solução deste ião [39, 44]. A cristalinidade das HA's carbonatadas do tipo-B é inversamente proporcional à concentração de carbonato presente na estrutura apatítica e directamente proporcional à temperatura de reacção [40].

Tal como no caso das HA's do tipo-A, a incorporação do ião carbonato na estrutura apatítica altera as principais características destes materiais. As hidroxiapatites carbonatadas do tipo-B são caracterizadas por apresentarem um parâmetro de rede *a*- menor e um parâmetro *c*- maior que os da HA estequiométrica (ver tabela 2.2); diminuição do tamanho dos cristais; diminuição de cristalinidade e consequente perda de resolução das bandas de infravermelho características do grupo PO₄³⁻; alteração da morfologia típica dos cristais; maior solubilidade e os seus espectros de FTIR apresentam as bandas de absorção de infravermelho características deste tipo de substituição (1528, 1465 e 878 cm⁻¹) [2, 5].

As apatites biológicas, presentes nas calcificações normais e patológicas, são fundamentalmente hidroxiapatites carbonatadas do tipo-B [41] diferindo apenas na quantidade de carbonato [2].

2.7.3.3 Efeito do íon Cl^-

Foi observada a incorporação parcial do íon cloreto na estrutura de apatites preparadas a partir de soluções aquosas com concentração elevada deste íon. No entanto, é possível obter a substituição total dos íons OH^- pelos íons Cl^- em sistemas não aquosos [2].

Este tipo de substituição, provoca um aumento do parâmetro de rede $-a$ e uma diminuição do parâmetro $-c$ da estrutura apatítica (ver tabela 2.2).

2.7.3.4 Efeito dos íons Na^+ e K^+

As HA's sintéticas poderão também incorporar na sua estrutura (em substituição do íon Ca^{2+}) catiões monovalentes, tais como Na^+ e K^+ [34, 39, 43, 44-46, 49]. Para além destes íons, o íon Ca^{2+} também pode ser substituído por catiões divalentes (p. ex.: Mg^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+}) [40, 55, 61]. No entanto, este último tipo de substituição não será estudado dado que esta dissertação, centra-se no estudo de fosfatos de cálcio contendo substituições catiónicas de Na^+ e K^+ .

De Maeyer *et al* [69] mostraram que considerando apenas factores dimensionais (tabela 2.3), um íon Ca^{2+} poderá ser mais facilmente substituído por um íon Na^+ do que por um íon K^+ .

Tabela 2.3: Comparação dos raios atômicos dos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} .

Íon	Raio atômico (nm)
Cálcio, Ca^{2+}	0,100
Sódio, Na^+	0,102
Potássio, K^+	0,138

Uma vez que o raio atómico do ião Na^+ é semelhante ao raio atómico do ião Ca^{2+} , não se observa qualquer alteração dos parâmetros de rede das estruturas apatíticas contendo esta substituição, em relação aos parâmetros de rede da HA sem substituições (ver tabela 2.2). A extensão da incorporação deste mesmo ião aumenta com a incorporação simultânea de CO_3^{2-} (como referido anteriormente na secção 2.7.3.2).

2.7.4 Mecanismos de substituição possíveis

Apesar de ser, globalmente, aceite a existência de uma incorporação simultânea do par $\text{Na}^+/\text{CO}_3^{2-}$ na estrutura da hidroxiapatite, não existe um consenso acerca do mecanismo responsável por esta substituição. Os mecanismos de substituição propostos na literatura são numerosos e não consistentes. No entanto, convém referir que esta variabilidade poderá, em parte, ser atribuída aos diferentes métodos experimentais usados (na preparação destas HA's carbonatas): sínteses realizadas a alta temperatura baseadas em reacções no estado sólido, sínteses hidrotérmicas e sínteses por precipitação em solução aquosa [69].

Sabendo que para as condições de síntese estudadas nesta dissertação foram incorporados, na estrutura apatítica dos sólidos obtidos, por exemplo os iões CO_3^{2-} e Na^+ serão apresentados, nesta secção, os mecanismos de substituição possíveis para estes iões.

Apresentam-se na tabela 2.4, as substituições básicas que podem ser utilizadas para explicar a incorporação do par $\text{Na}^+/\text{CO}_3^{2-}$ na estrutura da hidroxiapatite.

Tabela 2.4: Substituições básicas usadas para explicar a incorporação de Na^+ e CO_3^{2-} na rede apatítica.

Notação	Substituição básica	Balanço de carga
A	$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{Na}^+$	-1
B	$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{V}^{\text{Ca}}$	-2
C	$\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{CO}_3^{2-}$	+1
D	$\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{OH}^-$	0
E	$\text{OH}^- \rightarrow \text{CO}_3^{2-}$	-1
F	$\text{OH}^- \rightarrow \text{V}^{\text{OH}}$	+1

V^{X} representa uma lacuna na sub-rede da espécie X.

A partir das substituições acima apresentadas podem obter-se, por combinações lineares simples, os mecanismos de substituição possíveis para os íons sódio e carbonato (tabela 2.5).

Tabela 2.5: Mecanismos de substituição possíveis para a incorporação dos íons Na^+ e CO_3^{2-} na estrutura da hidroxiapatite.

Combinação das substituições básicas	Símbolo	Mecanismo de substituição
B + C + F	I	$\text{Ca}^{2+} + \text{PO}_4^{3-} + \text{OH}^- \rightarrow \text{V}^{\text{Ca}} + \text{CO}_3^{2-} + \text{V}^{\text{OH}}$
B + 2C	II	$\text{Ca}^{2+} + 2 \text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{V}^{\text{Ca}} + 2 \text{CO}_3^{2-}$
A + C	III	$\text{Ca}^{2+} + \text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{Na}^+ + \text{CO}_3^{2-}$
A + F	IV	$\text{Ca}^{2+} + \text{OH}^- \rightarrow \text{Na}^+ + \text{V}^{\text{OH}}$
D	V	$\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{OH}^-$
E + F	VI	$2 \text{OH}^- \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{V}^{\text{OH}}$

2.7.5 Espectro de Raman característico da hidroxiapatite

Para além das técnicas experimentais anteriormente mencionadas, também se pode utilizar a espectroscopia de Raman na caracterização de fosfatos de cálcio. Nos últimos anos, o uso desta técnica de análise tem vindo a aumentar e poder-se-á mesmo afirmar que a associação da espectroscopia de Raman com a espectroscopia de absorção no infravermelho revela algumas vantagens em relação a outras técnicas experimentais: (a) a quantidade de amostra necessária é, de facto, bastante reduzida e os sólidos podem ser analisados sem (ou quase sem) preparação prévia; (b) podem ser analisadas amostras “húmidas”; (c) a informação molecular obtida, por combinação destas técnicas, permite estudar (e identificar) os grupos funcionais, o tipo de ligações e as conformações moleculares características das amostras em estudo [85].

No entanto, o estudo de fosfatos de cálcio por espectroscopia de Raman ainda se apresenta como um assunto relativamente pouco clarificado. Esta afirmação baseia-se no facto do espectro de FT-Raman da HA sintética ser segundo alguns autores [85], dominado pela presença de dois picos (~ 774 e 690 cm^{-1}) que não estão presentes no espectro de FT-Raman apresentado por outros autores [9], para a mesma fase. A única zona comum a estes espectros surge para um número de onda de 952 cm^{-1} .

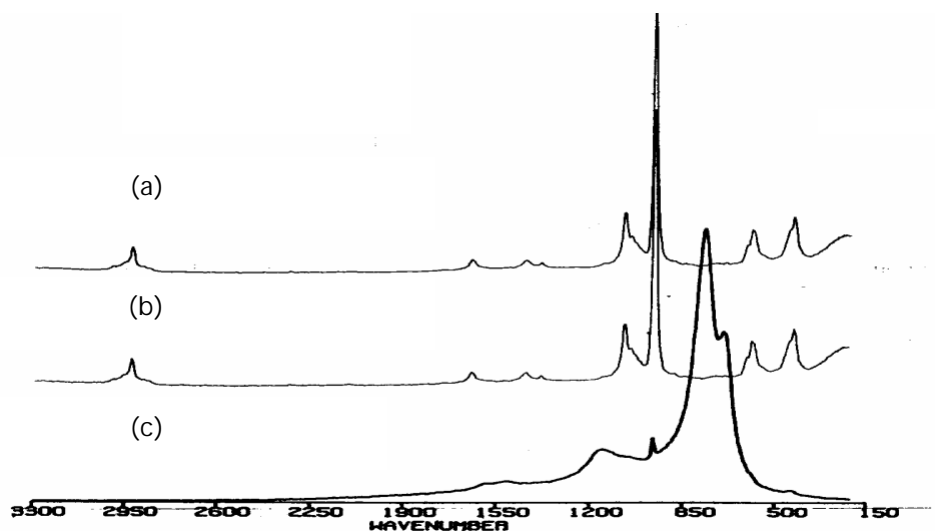


Figura 2.13: Espectro de FT-Raman característico das apatites biológicas presentes no tecido ósseo de uma ovelha **(a)**; no osso humano **(b)** e da HA sintética **(c)** [85].

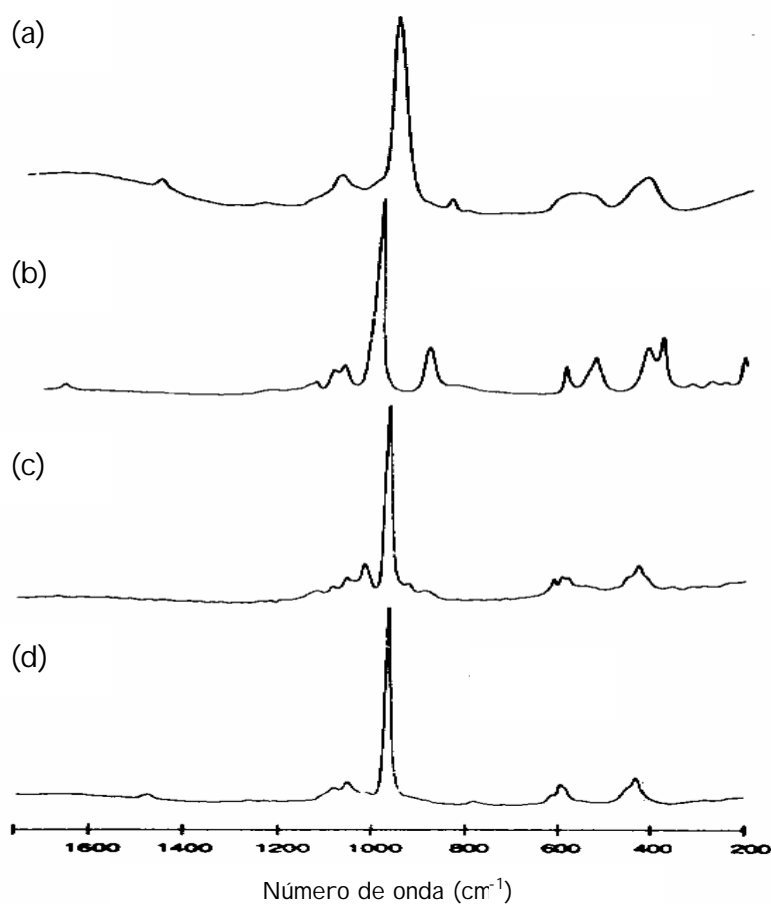


Figura 2.14: Espectros de FT-Raman característicos de alguns fosfatos de cálcio sintéticos, apresentados por G. R. Sauer [9]: **(a)** ACP; **(b)** DCPD; **(c)** OCP; **(d)** HA.

De acordo com os resultados obtidos no decorrer do trabalho experimental, poder-se-á afirmar que a hidroxiapatite sintética, obtida por precipitação em solução aquosa, pode apresentar qualquer um dos espectros de FT-Raman anteriormente apresentados. De facto, observou-se que a HA sintetizada a pH 9 e 37 °C, em presença do dióxido de carbono atmosférico sem adição de iões estranhos apresentava um espectro de FT-Raman semelhante ao da figura 2.14. As hidroxiapatites obtidas, nas mesmas condições de temperatura e pH, em presença do dióxido de carbono atmosférico e dos iões sódio, potássio e cloreto apresentam espectros idênticos ao da figura 2.13. A diferença entre espectros, parece resultar do tipo de iões incorporados na estrutura apatítica.

2.8 TRANSFORMAÇÃO *IN VITRO* DO ACP, DCPD, OCP E HA

2.8.1 Introdução

Alguns dos fosfatos de cálcio mencionados ao longo desta dissertação, por exemplo o ACP, DCPD, OCP e β -TCP, têm sido classificados como possíveis precursores das apatites biológicas presentes em calcificações patológicas e/ou normais [2, 5].

Estas transformações de fase poderão ser favorecidas ou inibidas por variação das condições do meio em estudo. Por exemplo, a variação do pH, da temperatura, da concentração e da própria composição dos materiais (presença de outros iões e/ou moléculas para além do cálcio e do fósforo inorgânico), poderão influenciar a transformação de um tipo de fosfato de cálcio num outro.

Assim sendo, e para que se compreenda melhor o processo de integração e reconstituição óssea é apresentado, nesta secção, um breve estudo sobre a transformação *in vitro* de alguns fosfatos de cálcio (ACP, DCPD, OCP e HA).

2.8.2 Transformações, em solução, de alguns fosfatos de cálcio

2.8.2.1 ACP, Fosfato de cálcio amorfo

O estudo do envelhecimento do ACP em solução aquosa revelou que este fosfato de cálcio, por intermédio de uma fase precursora do tipo OCP, se transforma em apatite (AP) [56, 57]. Contudo, em presença do ião Mg^{2+} , para valores de pH neutro ou mais elevados, foi observada a transformação ACP \rightarrow DCPD [71]. Quando a solução ou o próprio ACP contém o ião Mg^{2+} poderá também ocorrer transformação do ACP em β -TCMP [72].

Em solução aquosa, a transformação ou hidrólise do ACP em outros tipos de fosfato de cálcio (p. ex.: DCPD, OCP, β -TCMP, HA) dever-se-á realizar por dissolução e conseqüente reprecipitação. Os produtos resultantes da transformação do ACP dependem da composição do ACP e do pH do meio. O ACP contendo magnésio poder-se-á transformar em DCPD ou em HA pouco cristalina, dependendo do pH da solução [2].

2.8.2.2 DCPD, Fosfato de cálcio di-hidratado

Em solução de acetato de sódio ou em soluções contendo pequenas quantidades de Ca^{2+} , a pH 7 ou 7,5, a 25, 37 ou 60 °C durante 156 h a 1 mês (dependendo da quantidade de DCPD), foi observada a transformação DCPD \rightarrow OCP [2]. No entanto, a presença do íon Mg^{2+} , em solução, inibe este tipo de transformação [73].

A transformação DCPD \rightarrow AP é facilitada em presença dos íons F (mesmo para valores de pH = 4). A presença em solução dos íons F ou CO_3^{2-} , durante a transformação do DCPD em AP, dá origem a apatites (AP) substituídas - contendo estes mesmos íons [74]. No entanto, em soluções contendo os íons $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ é favorecida a transformação do DCPD em β -TCMP [75].

2.8.2.3 OCP, Fosfato octacálcico

A transformação OCP \rightarrow AP é influenciada *in vitro* pelos seguintes factores: pH, temperatura, concentração e composição da solução (p. ex.: presença de íons tais como F^- , CO_3^{2-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, Mg^{2+} , citrato, oxalato, etc.), e pelo tamanho dos cristais de OCP [2, 5]. Quando foram colocados cristais de OCP, de grande dimensão (0,6 mm de comprimento, agregados em esferolites), em meios contendo os íons F^- , CO_3^{2-} , Ca^{2+} ou Na^+ , não foi observada qualquer transformação de fase. No entanto, verificou-se uma transformação substancial em apatite, de cristais de OCP, com pequena dimensão, colocados no mesmo meio [76].

Tomazic *et al.* [4] estudaram, em diferentes meios, a hidrólise do OCP e observaram a formação de apatites não estequiométricas que incorporaram alguns dos íons inicialmente presentes no meio tais como CO_3^{2-} , Mg^{2+} , F^- , K^+ e Na^+ .

Segundo Brown [73], a presença do ião Mg^{2+} inibe a transformação do OCP em AP. Esta transformação de fase também é inibida quando estão presentes no meio os iões citrato e pirofosfato [76].

2.8.2.4 HA, hidroxiapatite

Quando se colocou um dente numa solução ácida de fosfato, a 25 e 37 °C, observou-se a transformação HA? DCPD. Os cristais de DCPD assim obtidos começaram por se formar sobre a superfície do esmalte ou da própria dentina, dependendo do pH inicial da solução [77]. R. P. Shellis, *et al* [11] também verificaram a formação de DCPD durante o envelhecimento do esmalte dentário humano, a 37 °C, em soluções ácidas. Estes resultados estão de acordo com o exposto no capítulo 2.

Em resumo, poder-se-á concluir que a transformação, em solução, de um tipo de fosfato de cálcio num outro se poderá realizar por dissolução (completa ou parcial) da fase inicial, seguida da reprecipitação de uma outra fase. Algumas transformações também se podem efectuar *in situ*. Muitos dos iões presentes no meio poderão ser incorporados nos produtos resultantes da transformação. Factores como o pH, temperatura e composição da solução podem promover ou inibir as reacções de transformação [2, 5].

3. MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE

3.1 INTRODUÇÃO

O estudo dos fosfatos de cálcio sintéticos, biológicos e minerais requer o uso de alguns dos métodos físicos mais sofisticados. Estes incluem: difracção de raios X, difracção de electrões e neutrões, microscopia electrónica de varrimento e de transmissão, microanálise por raios X (EDS), ressonância de spin de electrões, ressonância magnética nuclear, espectroscopia de infravermelho, análise termogravimétrica [2] e mais recentemente a espectroscopia de Raman [9]. Apresenta-se, de forma resumida, na tabela 3.1 o tipo de informação obtida com alguns dos métodos físicos anteriormente mencionados.

Tabela 3.1: Métodos analíticos e tipo de informação obtida^{*}.

Método analítico	Tipo de informação
Difracção de raios X, DRX	Identificação de fases cristalinas; cristalinidade (tamanho dos cristais); tensões residuais nos cristais; parâmetros de rede (reflectindo o tipo e quantidade de substituição na estrutura)
Espectroscopia de infravermelho, IV	Presença de grupos funcionais; determinação de CO ₃ ; tipo de substituição (p. ex. CO ₃ por PO ₄); pureza; cristalinidade (grau de perfeição)
Microscopia electrónica de varrimento, SEM	Morfologia dos cristais (tamanho e forma)
Microscopia electrónica de transmissão, TEM	Propriedades ultra-estruturais: defeitos de rede; tamanho e morfologia dos cristalitos; orientação
Ressonância magnética nuclear, RMN	Ligações -H; efeito de F
Análise termogravimétrica, TG	Estabilidade térmica dos fosfatos de cálcio e quantificação dos componentes voláteis (p. ex. CO ₃ ; HPO ₄ ; H ₂ O)

^{*} Adaptação da tabela 2.2, ref. [2] p.22.

3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO

3.2.1 Reagentes e preparação de soluções

Todos os reagentes químicos usados nas sínteses de fosfatos de cálcio são pró-análise (p.a.), foram adquiridos no comércio e utilizados sem qualquer purificação. Todos os reagentes sólidos foram secos em estufa ou excicador (dependendo do seu ponto de fusão) antes da utilização.

Tabela 3.2: Reagentes usados na síntese de fosfatos de cálcio e sua identificação.

<i>Reagente</i>	<i>Marca</i>	<i>Referência de catálogo</i>
Acetato de cálcio	Riedel-de Haën	25011
ácido nítrico conc.	Merck	1.00456.2500
Cloreto de potássio	Merck	1.04936.1000
Cloreto de sódio	Panreac	131659
di-hidrogenofosfato de amónio	Panreac	131126
sol. aq. conc. ácido acético	Aldrich	32,009-9
sol. aq. conc. amoníaco	Aldrich	40,766-6

Para a preparação das soluções e lavagem dos sólidos obtidos foi usada água desionizada.

O material de vidro utilizado foi previamente lavado com uma solução de ácido nítrico, de concentração aproximada 3 mol dm^{-3} , passado por água corrente e água destilada, e seco em estufa à temperatura de aproximadamente 40°C .

3.2.2 Técnicas experimentais usadas na caracterização dos sólidos obtidos

Todos os sólidos sintetizados foram secos ao ar e posteriormente caracterizados pelas técnicas experimentais de seguida mencionadas.

3.2.2.1 Análise termogravimétrica, TG

A análise termogravimétrica dos sólidos obtidos foi realizada numa termobalança de marca Shimadzu (TGA-50), com uma velocidade de aquecimento de 10 °C / minuto, de 5 a 900 °C.

3.2.2.2 Difracção de Raios X, DRX

Os difractogramas de pós dos diferentes sólidos sintetizados foram obtidos num difractómetro de raios X de marca Rigaku Geigerflex Dmax-C, equipado com monocromador curvo de grafite, utilizando radiação CuK α . Foram também determinados, por intermédio do programa MDI/JADE6, os parâmetros de rede de alguns dos sólidos sintetizados.

3.2.2.3 Espectroscopia de Infravermelho, IV

Os espectros de absorção no infravermelho foram registados num espectrofotómetro de marca Mattson 7000 com transformadas de Fourier (FTIR), processado por computador, numa gama de número de onda entre 4000-400 cm⁻¹, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr). Sempre que necessário, também se procedeu à comparação deste espectro com os espectros existentes na base de

dados do aparelho de FTIR. Este procedimento, permitiu identificar a existência de misturas de fases e realizar a sua (possível) quantificação.

3.2.2.4 Espectroscopia de Raman com transformadas de Fourier, FTR

Os espectros de FT-Raman foram adquiridos num espectrofotómetro de marca Bruker (RSF 100/s), num intervalo de número de onda entre 50-3500 cm^{-1} . O laser utilizado é do tipo Nd: YAG com $\lambda = 1,064 \text{ }\mu\text{m}$. As amostras foram analisadas sem qualquer tipo de preparação.

3.2.2.5 Espectroscopia por Emissão de Plasma Induzido, ICP

Para determinar a concentração total dos elementos cálcio, fósforo, sódio e potássio nos sólidos sintetizados foram preparadas soluções aquosas dos mesmos, após dissolução em ácido nítrico concentrado. A determinação analítica dos elementos referidos foi feita num espectómetro Jobin Yvon 70 Plus, no Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro.

3.2.2.6 Microscopia Electrónica de Varrimento, SEM

Para a observação, por SEM, da morfologia dos pós sintetizados colocou-se uma pequena quantidade de amostra sobre uma fita adesiva de dupla face (previamente fixada num suporte concebido para o aparelho em questão). De seguida, as amostras foram cobertas com uma fina película de carbono e observadas num microscópio electrónico de varrimento de marca Hitachi S4100. Posteriormente, foi realizada a microanálise por raios X (EDS), dos sólidos observados por SEM.

3.3 ENVELHECIMENTO DE ALGUNS DOS FOSFATOS DE CÁLCIO SINTETIZADOS

3.3.1 Reagentes usados na preparação da solução de SBF

Tal como na primeira parte deste trabalho, todos os reagentes químicos usados no decorrer das experiências de envelhecimento são *p.a.*, foram adquiridos no comércio e utilizados sem qualquer purificação.

Tabela 3.3: Reagentes usados na preparação da solução de SBF e sua identificação.

<i>Reagente</i>	<i>Marca</i>	<i>Referência de catálogo</i>
ácido clorídrico	Fluka	71394
cloreto de cálcio hexa-hidratado	BDH	100694 A
cloreto de magnésio hexa-hidratado	Merck	2611211
cloreto de potássio	Merck	4936.500
cloreto de sódio	Merck	1.06404.1000
hidrogenocarbonato de sódio	BDH	10247
hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado	Merck	12040.0250
sulfato de sódio anidro	Merck	6649
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck	1.08382.0500

3.3.2 Técnicas experimentais utilizadas

No final do tempo de envelhecimento procedeu-se à leitura dos valores de pH das soluções resultantes e determinaram-se as respectivas concentrações de cálcio, fósforo, sódio e potássio, por ICP.

Os sólidos obtidos foram secos ao ar e caracterizados por DRX, FTIR, SEM e EDS (nos instrumentos anteriormente descritos - secção 3.2.2). Posteriormente, foram determinados os parâmetros de rede de alguns dos sólidos envelhecidos (ver secção 3.2.2.2).

4. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO

4.1 INTRODUÇÃO

O trabalho experimental desenvolvido no decorrer desta dissertação insere-se num projecto de investigação bastante mais vasto, em que se pretende estudar a influência dos iões presentes no plasma humano na formação e transformação *in vitro* da hidroxiapatite e seus precursores.

Com este objectivo, numa primeira parte, foram realizadas sínteses a partir de soluções sobressaturadas em Ca^{2+} e HPO_4^{2-} , na presença e ausência de alguns dos iões existentes no plasma humano (Na^+ , K^+ , Cl^- e CO_3^{2-}), a temperatura (37 e 45 ± 1 °C) e pH ($5,00$ a $9,00 \pm 0,05$) constantes. No caso das sínteses em presença dos iões Na^+ , K^+ e Cl^- , os sais contendo os iões cálcio e fósforo foram adicionados a soluções de NaCl e NaCl+KCl de concentração igual à do plasma humano.

O método de síntese seguido foi o mesmo que o grupo de investigação tem vindo a adoptar e que foi estudado (e optimizado) num trabalho desenvolvido anteriormente [28], que tinha como principal objectivo estudar e verificar as condições de cristalização do OCP.

4.2 MÉTODO DE SÍNTESE E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Descreve-se nesta secção o método e as condições experimentais utilizadas no decorrer da síntese dos fosfatos de cálcio.

Inicialmente, prepararam-se 100 cm³ de uma solução 0,10 mol.dm⁻³ de di-hidrogenofosfato de amónio (NH₄H₂PO₄). Diluiu-se esta solução para 750 cm³ e procedeu-se à sua transferência para um balão de 2000 cm³ com três tubuladuras, mergulhado numa panela com glicerina líquida, colocada sobre uma placa de aquecimento. A solução descrita foi depois aquecida à temperatura de síntese pretendida (37 ou 45 °C).

Colocaram-se nas tubuladuras do balão um condensador, um eléctrodo medidor de pH e um funil de carga gotejante. De seguida, prepararam-se 250 cm³ de uma solução de acetato de cálcio (Ca(CH₃COO)₂) 0,04 mol.dm⁻³ e colocou-se esta solução no funil de carga. Acertou-se o pH da solução de NH₄H₂PO₄ para o valor pretendido (5,00-9,00), por adição de soluções aquosas diluídas de ácido acético e/ou amoníaco. Iniciou-se a adição gota a gota da solução de acetato de cálcio à solução de di-hidrogenofosfato de amónio durante 2h e 45m, com agitação contínua (por intermédio de uma barra magnética), mantendo constantes os valores da temperatura e do pH da solução.

Por fim, foi realizado o envelhecimento dos precipitados durante 1h, nas mesmas condições experimentais de pH e temperatura. Após este envelhecimento procedeu-se à sua filtração e deixaram-se secar ao ar. Os sólidos obtidos foram caracterizados pelas técnicas experimentais descritas na secção 3.2.2 desta dissertação.

Uma vez que a incorporação do ião carbonato era um dos assuntos em estudo, todas as sínteses foram realizadas ao ar (na presença do CO₂ atmosférico).

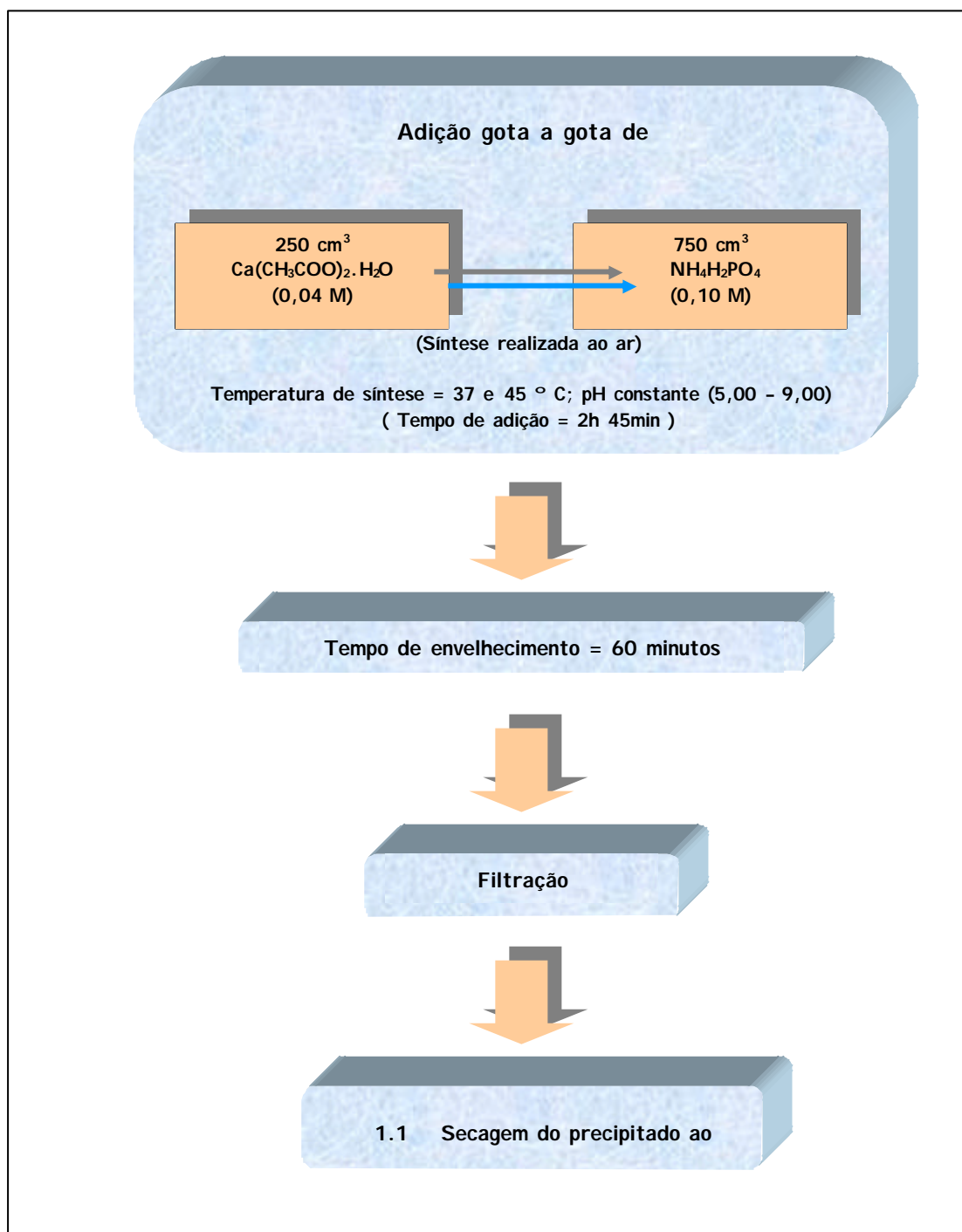


Figura 4.1: Representação esquemática do método de síntese e das condições experimentais usadas na síntese dos fosfatos de cálcio.

Como referido anteriormente, o principal objectivo destas sínteses consistiu no estudo das possíveis influências da composição inicial do meio e da temperatura na natureza das fases cristalinas obtidas. Deste modo, foram

realizadas várias sínteses (tendo por base o método experimental descrito) em diferentes condições, apresentadas na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Condições experimentais das diferentes sínteses realizadas.

Descrição síntese	Soluções	pH ($\pm 0,05$)	T(± 1 °C)
Sínteses em presença do íon CO_3^{2-} (realizadas ao ar)	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,1 mol. dm^{-3}); $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (0,04 mol. dm^{-3})	5,00 a 9,00	37 e 45
Sínteses em presença dos íões CO_3^{2-} , Na^+ e Cl^- (ao ar)	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,1 mol. dm^{-3}); $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (0,04 mol. dm^{-3}); NaCl (0,147 mol. dm^{-3})	5,00 a 9,00	37 e 45
Sínteses em presença dos íões CO_3^{2-} , Na^+ , K^+ e Cl^- (ao ar)	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,1 mol. dm^{-3}); $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (0,04 mol. dm^{-3}); NaCl (0,142 mol. dm^{-3}) + KCl (0,005 mol. dm^{-3})	5,00 a 9,00	37 e 45

Analisando a tabela acima representada poder-se-á observar a existência de três conjuntos de condições experimentais: sínteses realizadas ao ar sem adição de íões estranhos; sínteses realizadas ao ar com adição de NaCl; sínteses realizadas ao ar com adição de NaCl+KCl.

Convém referir que, para além dos valores de pH apresentados, também se realizaram sínteses para valores de pH intermédio. Estas experiências foram realizadas sempre que se verificou formação de uma fase diferente quando se aumentava de uma unidade o valor do pH de síntese.

4.3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

4.3.1 Caracterização dos sólidos obtidos em presença do ião CO_3^{2-}

Na tabela 4.2 é apresentada a composição química dos sólidos obtidos em presença do dióxido de carbono atmosférico (presença do ião carbonato).

Tabela 4.2: Composição química dos sólidos obtidos na presença de carbonato.

pH	37 °C				45 °C			
	Identif. amostra	Ca ^{a)}	P ^{a)}	Ca/P	Identif. amostra	Ca ^{a)}	P ^{a)}	Ca/P
5,0	111	-	-	b)	112	-	-	b)
5,5	1(1.5)1	22,9	17,4	1,02	1(1.5)2	24,5	17,1	1,11
6,0	121r	23,7	16,9	1,09	122r	33,3	17,1	1,50
6,5	1(2.5)1	32,5	17,1	1,47	c)	-	-	-
7,0	131	33,3	17,0	1,51	132	33,3	16,8	1,53
7,5	1(3.5)1	33,6	16,8	1,55	1(3.5)2	33,7	16,5	1,57
8,0	141	33,6	16,2	1,61	142	34,2	16,4	1,61
9,0	151	34,4	15,9	1,67	152	34,6	15,9	1,68

a) % m/m; **b)** Não ocorreu precipitação; **c)** Não se realizou.

Analisando a tabela 4.2, poder-se-á verificar que não ocorreu precipitação para as experiências realizadas a pH 5, independentemente da temperatura de síntese. Atendendo a este facto, realizaram-se sínteses nas mesmas condições de temperatura e composição do meio tendo apenas variado o valor de pH para 5,5.

A variação do valor de pH do meio de 5,0 para 5,5, na síntese realizada a 37 °C, conduziu à formação da única fase de fosfato (amostra 1(1.5)1) que apresenta uma relação Ca/P ? 1,04 (próxima do valor da relação Ca/P característica do DCPD puro – 1,00). De facto, os espectros de DRX e de infravermelho desta amostra (figura 4.2(a) e (b)) revelaram a existência de uma fase de fosfato, identificada como sendo DCPD.

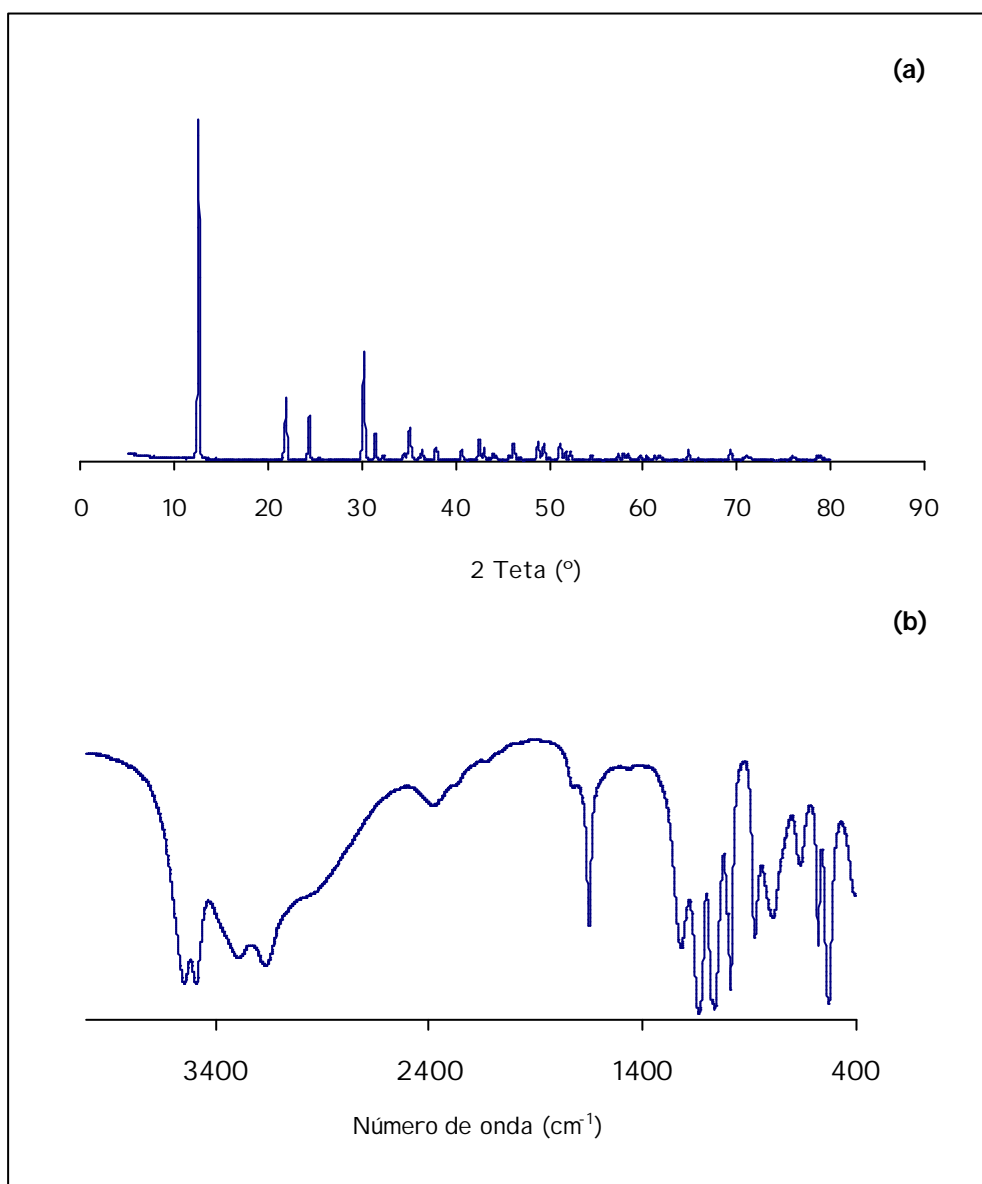


Figura 4.2: Espectros de DRX **(a)** e FTIR **(b)** da amostra 1(1.5)1 -sintetizada a pH 5,5 e 37 °C - identificada como DCPD.

A análise termogravimétrica desta amostra, também indicou a presença de uma fase do tipo DCPD. No termograma da figura 4.2(c), são visíveis duas zonas de perda de massa atribuíveis a esta fase: a primeira entre 50-200 °C (atribuída à saída das duas moléculas de água de hidratação); e a segunda entre 250-500 °C, correspondente à saída de água por reacção de condensação dos iões HPO_4^{2-} originando iões $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ (secção 2.4.3).

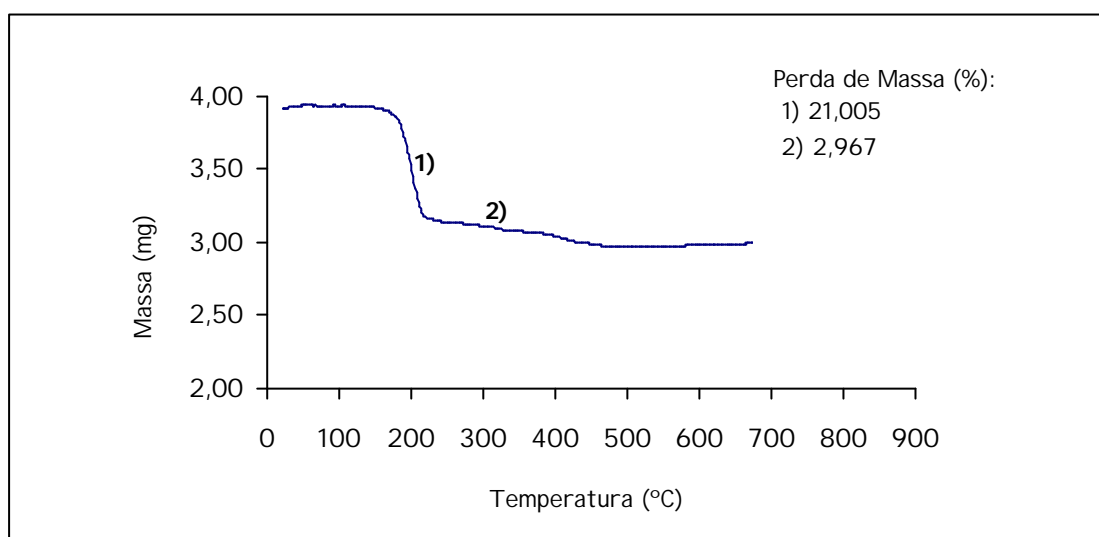


Figura 4.2(c): Termograma da amostra 1(1.5)1, onde são visíveis duas zonas de perda de massa - características da decomposição térmica do DCPD.

Uma vez que o espectrofotómetro de FTIR usado (secção 3.2.2.3) tinha uma base de dados razoável em relação aos fosfatos de cálcio, tentou-se uma outra identificação da amostra 1(1.5)1 por comparação com os espectros existentes na base de dados do próprio espectrofotómetro. O processo de identificação é realizado pelo próprio aparelho, tendo o utilizador apenas de seleccionar alguns parâmetros. Apesar de se terem obtido resultados concordantes com tudo o que foi referido anteriormente não se poderá, contudo, garantir a sua veracidade (tabela 4.3). Isto deve-se essencialmente à falta de informação acerca do modo de

funcionamento do software em questão. No entanto, os resultados obtidos são de facto interessantes, uma vez que apontam para a existência de uma única fase do tipo DCPD, sendo quase excluída a hipótese de haver presença de uma outra fase (OCP).

Tabela 4.3: Informação adquirida (informaticamente) a partir da comparação do espectro da amostra sintetizada a pH = 5,5 e 37 °C, com os espectros dos fosfatos de cálcio existentes na base de dados do aparelho de FTIR.

DCPD (%)	OCP (%)	Grau confiança (%)
100	-	100
95	5	65
90	10	56
85	15	49
80	20	42

NOTA: Este programa só dá incrementos de 5%

Os sólidos sintetizados a pH 6 (37 °C) e pH 5,5 (45 °C), amostras 121r e 1(1.5)2, apresentam uma relação Ca/P ? 1,1 (superior ao valor característico do DCPD puro ? 1,0 - e inferior ao valor teórico do OCP ? 1,3).

Tendo em atenção o valor das relações Ca/P anteriormente referidas, foram inicialmente consideradas duas explicações possíveis para o valor em questão:

- 1) incorporação do ião CO_3^{2-} nos sólidos, dado que as sínteses foram realizadas ao ar e/ou;
- 2) existência de uma mistura de fases (DCPD+OCP) nas referidas amostras (Ca/P_(DCPD) ? 1,0 ? Ca/P ? 1,1 ? Ca/P_(OCP) ? 1,3).

A aquisição dos espectros de absorção no infravermelho permitiu concluir que não houve incorporação do íon carbonato nos sólidos sintetizados (ausência das bandas de absorção características do grupo CO_3^{2-}). No entanto, a análise atenta do espectro de infravermelho da amostra 1(1.5)2 mostra uma alteração na intensidade das bandas de absorção a ~ 580 e 990 cm^{-1} (características da ligação P-O), em relação ao espectro do sólido 121r (figura 4.3).

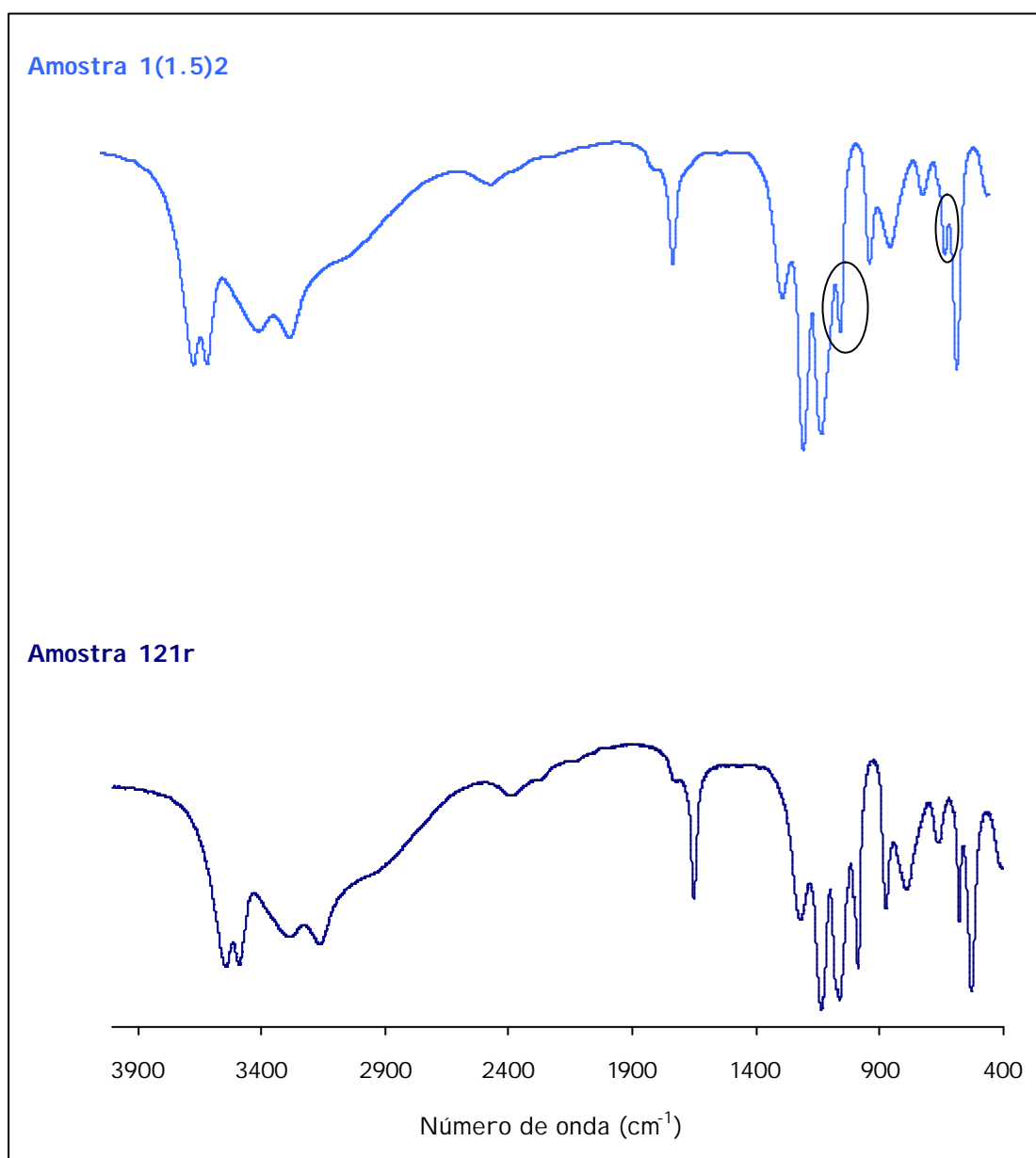


Figura 4.3: Espectros de FTIR dos sólidos 1(1.5)2 e 121r, onde é visível a diminuição da intensidade das bandas atribuídas à ligação P-O (assinaladas) para a amostra 1(1.5)2 em relação às bandas de absorção presentes na amostra 121r.

Aparentemente, apenas com base nos espectros apresentados na figura 4.3, poder-se-á afirmar que as amostras em estudo poderão ser caracterizadas como sendo DCPD. De facto, apresentam espectros de absorção no infravermelho idênticos ao desta fase de fosfato pura (secção 2.4.4). No entanto, a comparação dos seus espectros com os espectros existentes na base de dados do FTIR indicia a possibilidade de existir, nestas amostras, uma mistura de DCPD+OCP (estando esta fase presente em menor quantidade na amostra 121r - tabela 4.4).

Tabela 4.4: Informação adquirida (informaticamente) a partir da comparação do espectros das amostras 1(1.5)2 e 121r, com os espectros dos fosfatos de cálcio existentes na base de dados do FTIR.

pH	Amostra	T (°C)	Ca/P	DCPD (%)	OCP (%)	Grau confiança (%)
6,0	121r	37	1,09	100	-	100
6,0	121r	37	1,09	95	5	80
5,5	1(1.5)2	45	1,11	100	-	100
5,5	1(1.5)2	45	1,11	95	5	88

NOTA: Este programa só dá incrementos de 5%

Combinando a informação acima apresentada com o facto, anteriormente mencionado, destas amostras não revelarem a presença de carbonato poder-se-á então afirmar que o aumento das relações Ca/P se deve unicamente à presença de uma mistura de DCPD+OCP (sendo o DCPD a fase maioritária). No entanto, a aquisição dos difractogramas de pós destes mesmos sólidos, confirmou a presença desta mistura apenas para o sólido 1(1.5)2 (figura 4.4).

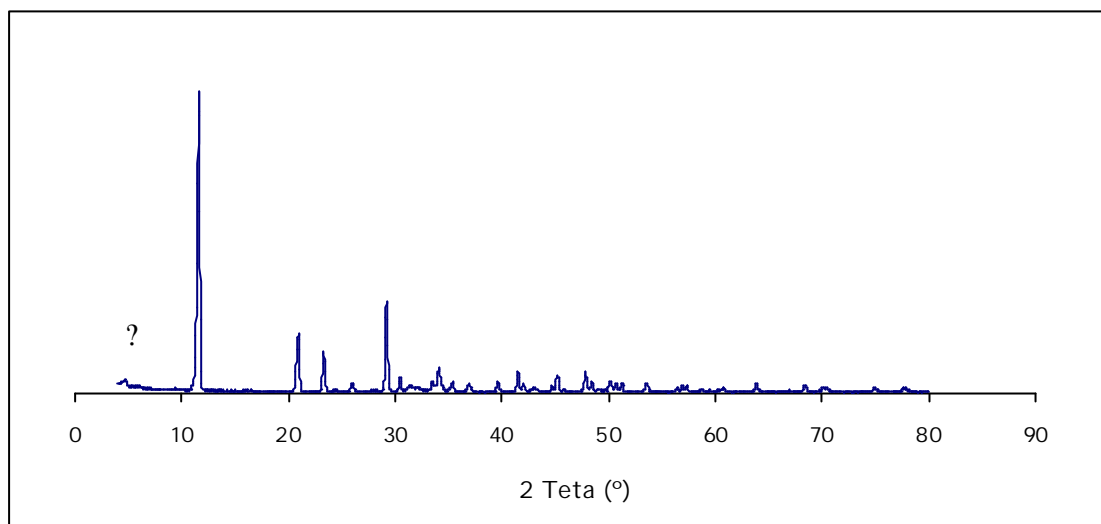


Figura 4.4: Difractograma de pós da amostra sintetizada a pH 5,5 e 45 °C, onde se pode observar a presença do pico característico do OCP (?).

No caso da amostra 121r, não foi possível confirmar através do seu espectro de DRX a presença de uma outra fase, para além do DCPD. Contudo, a observação por SEM deste mesmo sólido revelou a existência de cristais com duas morfologias distintas, uma característica de DCPD e a outra, bastante minoritária, com a morfologia típica dos cristais de OCP – figura 4.5(a) e (b). Este facto, permitiu concluir que a quantidade de OCP presente na amostra 121r é bastante reduzida (situada abaixo do limite de detecção da técnica de DRX), e confirmou a capacidade da técnica de IV na detecção de misturas de fases. Recorde-se que antes de se proceder à comparação dos espectros das amostras em estudo com os existentes na base de dados do FTIR, foi possível observar uma variação da intensidade de absorção de algumas bandas características da ligação P-O.

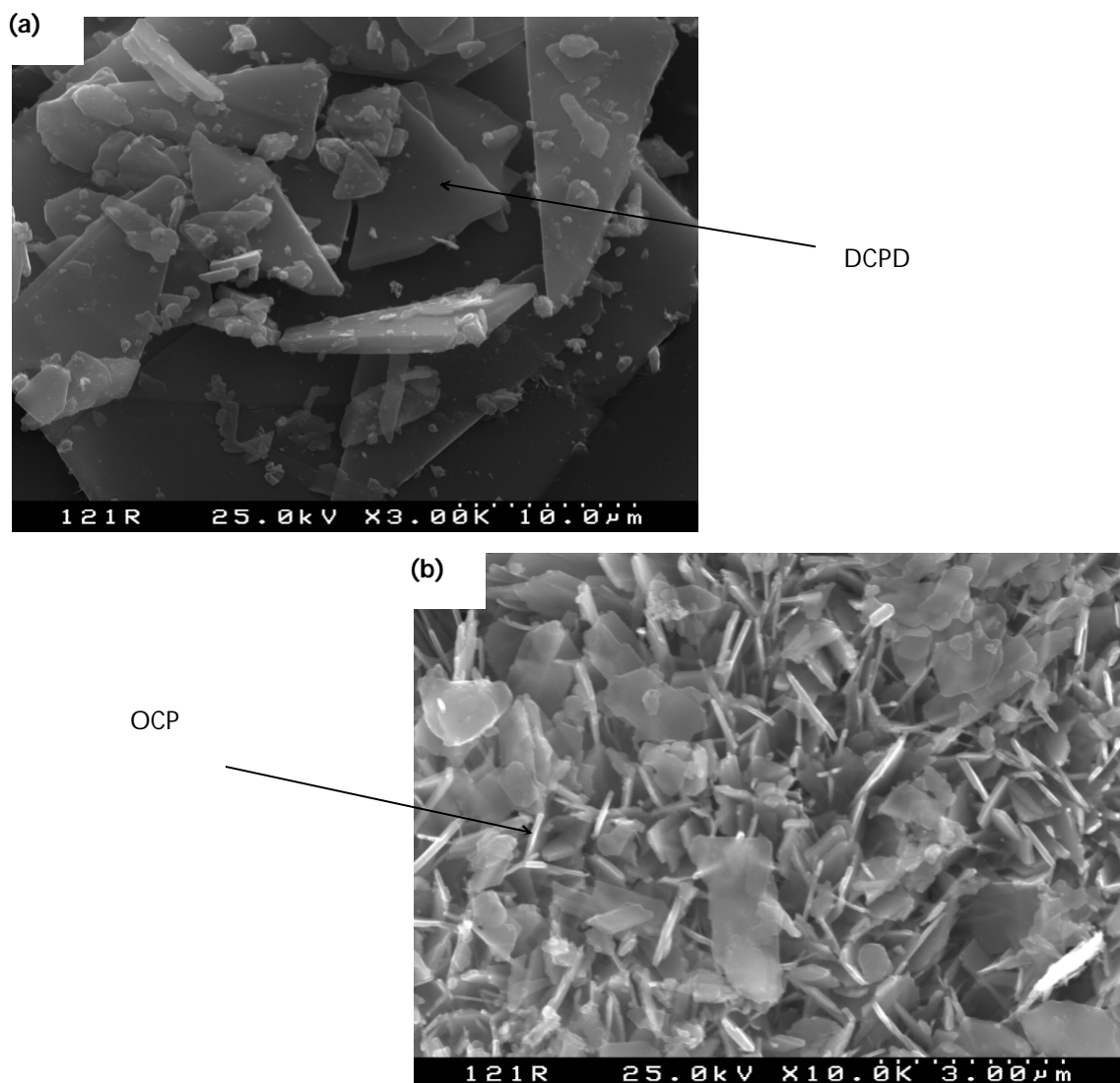


Figura 4.5: Imagens de SEM da amostra 121r (DCPD+OCP): **(a)** cristais com morfologia do tipo DCPD; **(b)** cristais morfologicamente semelhantes a OCP.

Analisando a tabela 4.2 poder-se-á facilmente verificar que as relações Ca/P dos sólidos sintetizados entre pH = 6,5 - 7,5 (37 °C) e pH = 6 - 7,5 (45 °C) são de aproximadamente 1,48, para as amostras sintetizadas a 37 °C, e de 1,52 para os sólidos obtidos a 45 °C.

Tal como nas amostras anteriormente estudadas, foram colocadas duas explicações possíveis para os valores apresentados:

- 1) a incorporação do ião CO_3^{2-} nos sólidos sintetizados e/ou;

2) existência de uma mistura de fases (OCP+HA) nas amostras em questão ($\text{Ca/P}_{(\text{OCP})} \approx 1,33 \approx \text{Ca/P} \approx 1,50 \approx \text{Ca/P}_{(\text{HA})} \approx 1,67$).

A análise dos espectros de infravermelho dos sólidos em estudo revelou a presença de uma fase do tipo OCP (figura 4.6(a)) e indicou a presença de pequenas bandas de absorção características do ião carbonato, em substituições do tipo B (secção 2.7.3.2), principalmente a banda a 870cm^{-1} . No entanto, o termograma da amostra 131 (figura 4.6(b)) não apresenta perda de massa no intervalo de temperatura característica deste ião (secções 2.5.3 e 2.7.2.4), o que pode ser resultado de uma menor sensibilidade desta técnica analítica.

Para além de se ter estudado a possibilidade de incorporação do ião carbonato, também se efectuou a análise da segunda hipótese anteriormente apresentada. Contudo, através dos espectros de raios X não foi possível detectar a existência de uma mistura de fases (OCP+HA). Os difractogramas destas amostras (figura 4.7) são idênticos ao espectro de DRX característico do OCP.

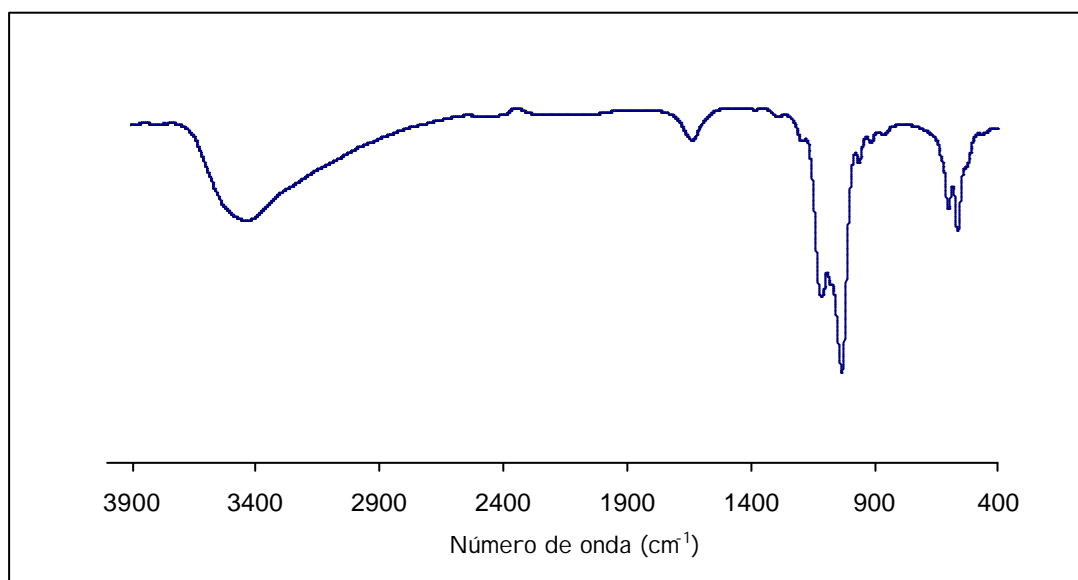


Figura 4.6 (a): Espectro de FTIR da amostra 131: são visíveis as bandas atribuídas ao carbonato (~ 1450 , 1410 e 870cm^{-1}), bem como as bandas de absorção do ião HPO_4^{2-} (~ 865 e 910cm^{-1}), características do OCP.

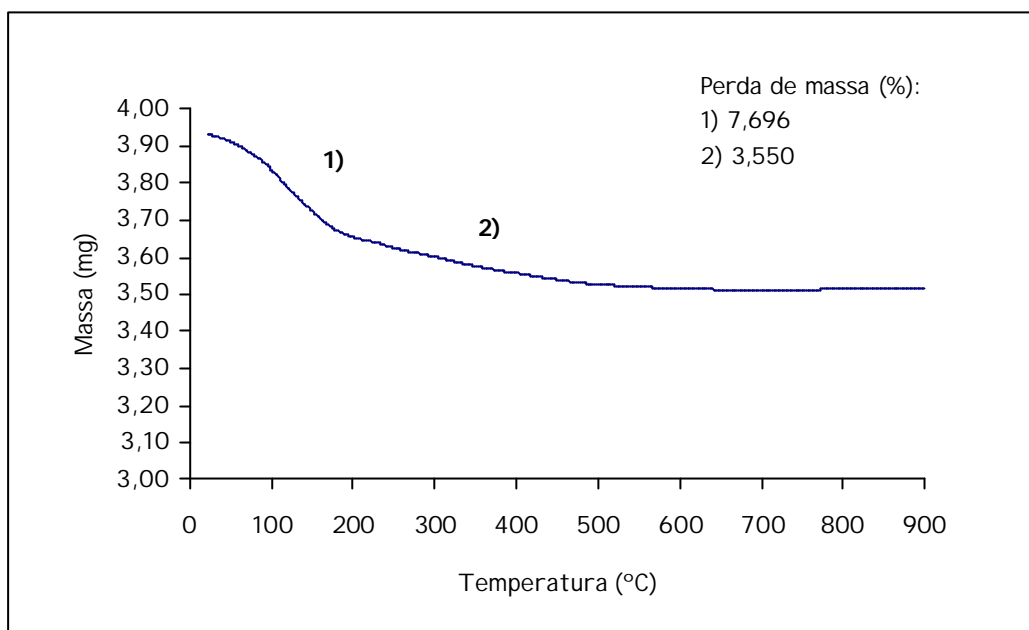


Figura 4.6 (b): Termograma da amostra 131, onde são visíveis duas zonas de perda de massa. A primeira correspondente à saída de água e a segunda à formação de pirofosfato.

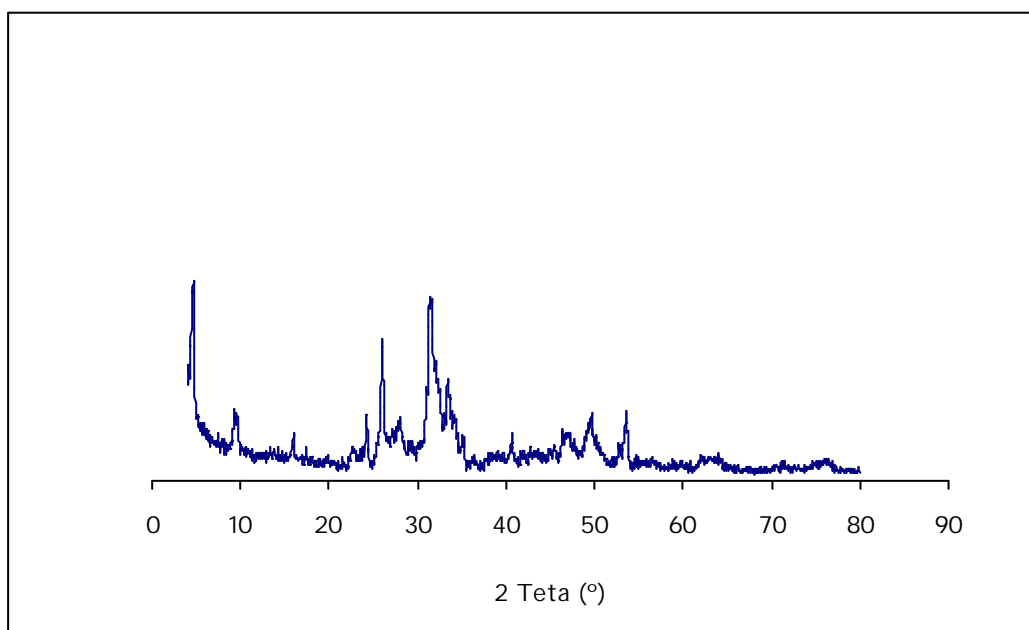


Figura 4.7: Espectro de DRX da amostra 131 (semelhante ao espectro característico do OCP - secção 2.5.4).

Os resultados obtidos a partir da comparação dos espectros das amostras em estudo com os espectros existentes na base de dados do próprio espectrofotômetro, indicaram uma vez mais a possibilidade de existir uma mistura de fases (OCP+HA) nestes sólidos – tabela 4.5. Apesar de, no caso das amostras anteriores, já se terem obtido resultados bastante concordantes com a segunda hipótese em estudo (presença de uma mistura de fases) poder-se-á verificar que os resultados agora apresentados têm um maior grau de confiança.

Tabela 4.5: Informações adquiridas (informaticamente) a partir da comparação dos espectros das amostras sintetizadas entre pH = 6,5 - 7,5 (37 °C) e pH = 6 - 7,5 (45 °C), com os espectros dos fosfatos de cálcio existentes na base de dados do aparelho de FTIR.

pH	Amostra	T (°C)	Ca/P	OCP (%)	HA (%)	Grau confiança (%)
6,5	1(2.5)1	37	1,47	50	50	97
7,0	131	37	1,51	45	55	100
7,5	1(3.5)1	37	1,55	40	60	100
6,0	122r	45	1,50	50	50	99
7,0	132	45	1,53	35	65	97
7,5	1(3.5)2	45	1,57	35	65	98

NOTA: Este programa só dá incrementos de 5%. e só considera a possibilidade de duas fases em simultâneo.

A observação, por SEM, da morfologia destes sólidos não permitiu confirmar os resultados apresentados na tabela 4.5. Não é evidente a existência de uma morfologia característica da HA; no entanto, é observada a presença de cristais morfologicamente semelhantes ao OCP (figura 4.8(a) e (b)). Convém salientar que as condições experimentais utilizadas – pH do meio entre 6-7,5, temperaturas relativamente baixas (37 e 45 °C), tempo de envelhecimento de apenas 1 hora e a presença do ião carbonato - terão influência na cristalinidade dos sólidos. Deste modo, considerando que os resultados obtidos através da base de

dados do FTIR estarão correctos, ter-se-á formação de HA pouco cristalina (cristais com uma estrutura pouco definida), difícil de detectar e caracterizar [23, 31].

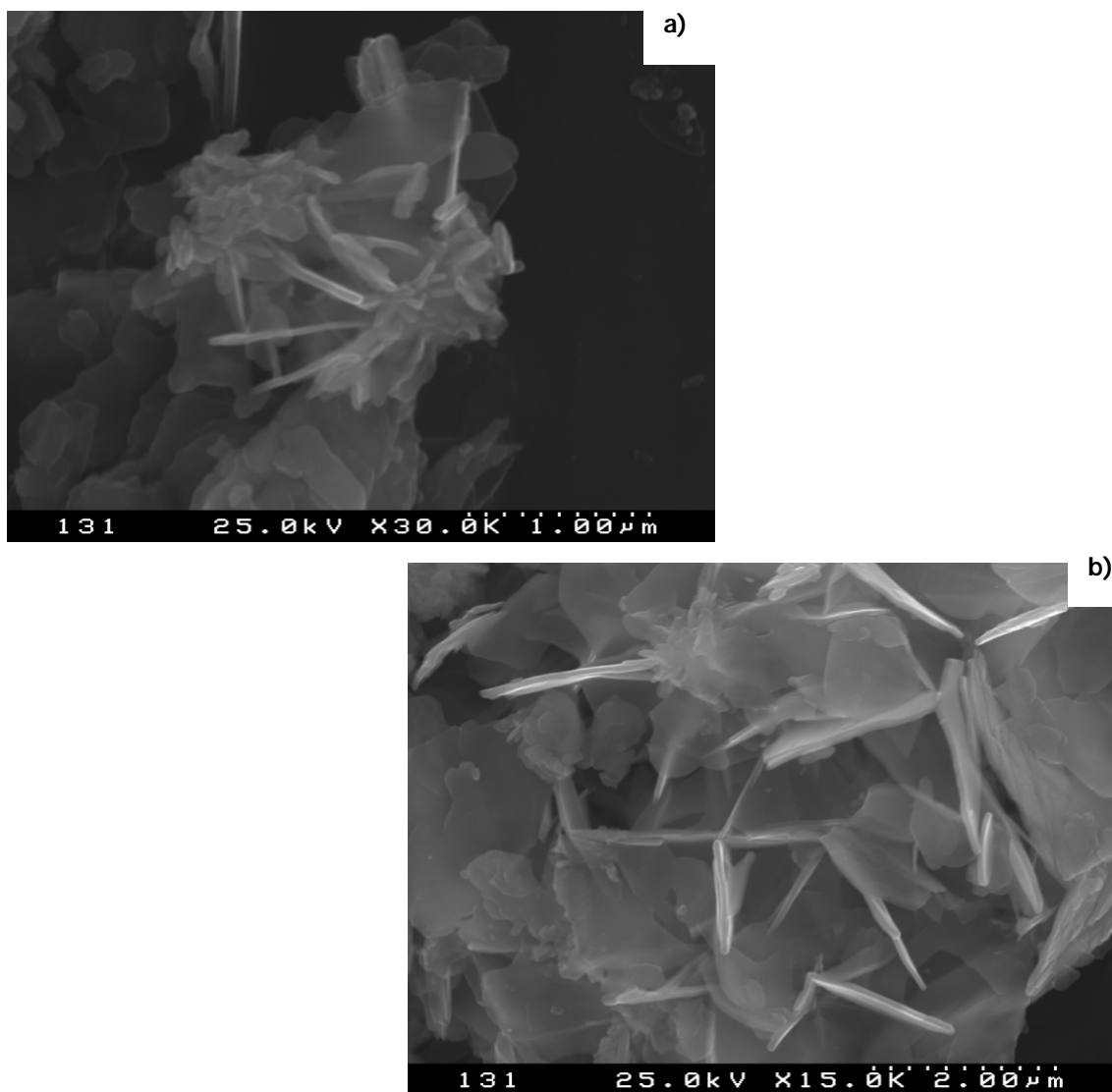


Figura 4.8(a) e (b): Imagens de SEM da amostra 131, obtida a pH 7 e 37°C. Os cristais observados apresentam uma morfologia idêntica à do OCP.

Os sólidos obtidos para os valores de pH mais elevados (pH = 8 e 9), a 37 e 45 °C, apresentam relações Ca/P (tabela 4.2) próximas do valor característico da HA estequiométrica - 1,67.

A análise por espectroscopia de infravermelho destes sólidos revelou a presença do ião carbonato. Apesar de serem visíveis, em todos os espectros, as bandas de absorção características do grupo CO_3^{2-} ($\sim 1450, 1410$ e 870cm^{-1}), elas são bem mais evidentes nos sólidos sintetizados a pH 9. Também se observa um ligeiro alargamento das bandas de absorção atribuídas ao grupo PO_4^{3-} , nas amostras 151 e 152 (sintetizadas a pH 9), o que está de acordo com a perda de cristalinidade da amostra, atribuída ao aumento da percentagem de carbonato.

De facto, a análise atenta da composição química destes sólidos (tabela 4.2) permite concluir que o aumento do pH do meio conduz a uma diminuição da percentagem de fosfato. Esta variação poderá ser explicada pela substituição do grupo PO_4^{3-} pelo grupo CO_3^{2-} , característica das HA's carbonatadas do tipo B (confirmada pelas bandas de absorção do CO_3^{2-} - figura 4.9).

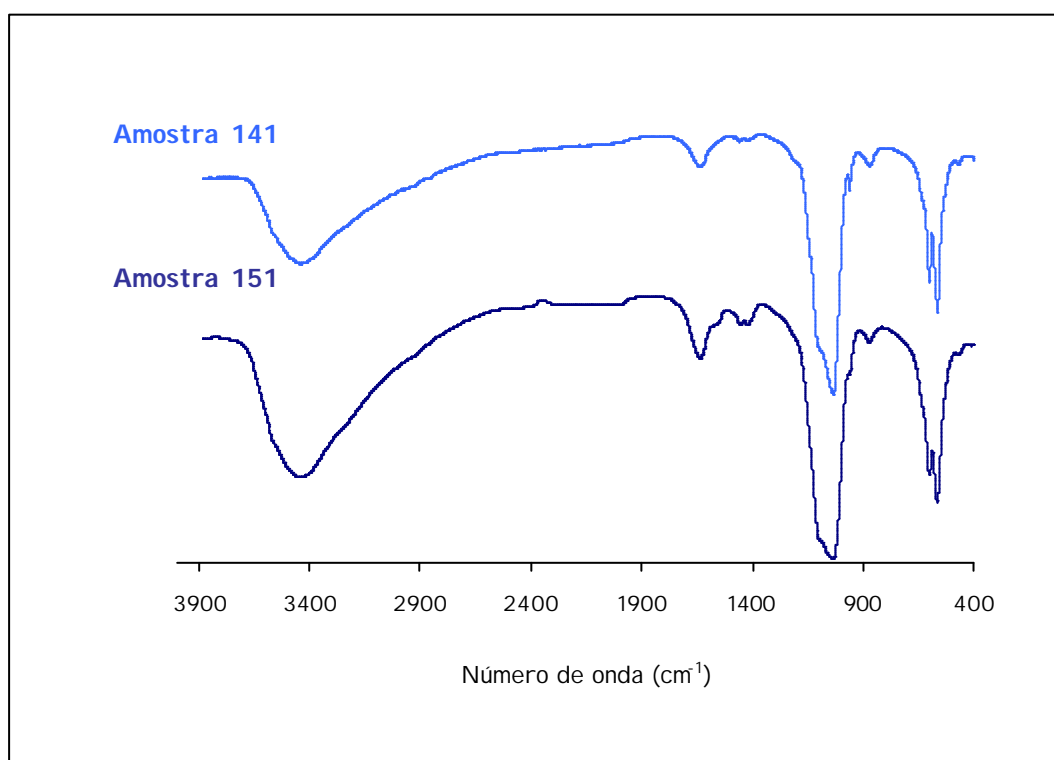
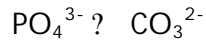
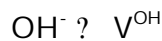


Figura 4.9: Espectros de infravermelho das amostras 141 e 151 (HA's carbonatadas do tipo-B), sintetizadas na presença do ião carbonato, respectivamente, a pH 8 e 9 (37 °C).

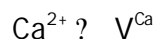
Os resultados obtidos indicam que o grupo CO_3^{2-} substituirá o grupo PO_4^{3-} , de acordo com a substituição básica C, apresentada na secção 2.7.4:



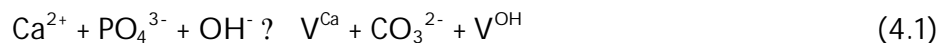
A análise pormenorizada da figura 4.9, também parece indicar que o aumento da quantidade de carbonato incorporado nas amostras em estudo, da amostra 141 para a amostra 151, conduz a uma diminuição na resolução das bandas de absorção do grupo OH (~ 3580 e 630 cm^{-1}) de acordo com a substituição básica F (secção 2.7.4). Por cada ião carbonato que substitui o ião fosfato na rede, haverá formação de uma lacuna na posição atómica do grupo OH:



Por outro lado, poder-se-á verificar que o aumento do valor de pH de 8 para 9 conduz à formação de HA's mais estequiométricas (para as sínteses realizadas a 37°C , por exemplo, a relação molar Ca/P passa de 1,61 para 1,67), sendo contudo, ainda deficientes em cálcio ou seja, existem lacunas nas posições atómicas do cálcio – substituição básica B:



Por fim, a combinação linear simples de todas as substituições básicas acima mencionadas conduz à equação 4.1:



Onde V_x representa a formação de uma lacuna na rede, na posição atómica da espécie X. Este resultado está de acordo com as experiências realizadas por Bonel *et al.* [68].

A substituição do grupo PO_4^{3-} pelo grupo CO_3^{2-} , poderia ter sido confirmada pelo estudo da relação entre as percentagens de fosfato e carbonato nos sólidos sintetizados. A existência de uma correlação linear entre as duas grandezas provaria a existência de uma competição, entre estes dois iões, para a mesma posição na rede da HA. Contudo, não foi possível quantificar o carbonato, apesar de terem sido feitas várias tentativas, por espectroscopia de infravermelho, de acordo com o método descrito por LeGeros [65, 66]. A principal dificuldade deveu-se ao facto de ser necessário usar uma microbalança, para realizar pesagens de quantidades bastante reduzidas de amostra de forma a evitar a saturação da pastilha, que não estava a funcionar nas melhores condições.

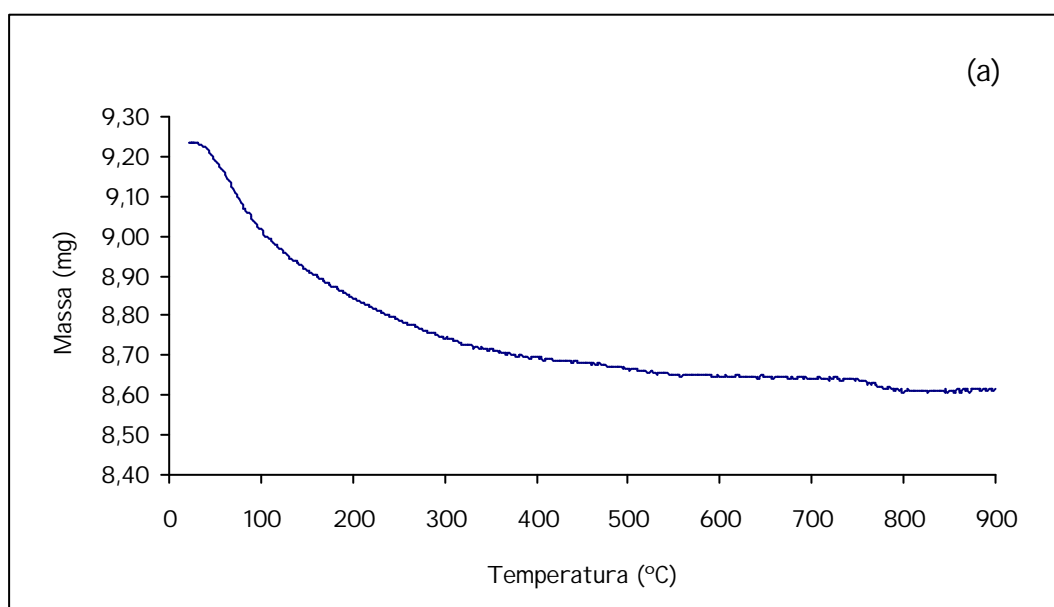
Deste modo, também se pensou em tentar quantificar o ião carbonato através da análise elementar do carbono presente nos sólidos. No entanto, para garantir a validade de uma eventual análise - dado que todo o carbono, orgânico e inorgânico, seria quantificado de uma só vez a uma dada temperatura - foi necessário averiguar da ausência de carbono orgânico nas amostras. Esta necessidade, advém do facto de se ter usado como reagente o acetato de cálcio (secção 4.2). Assim sendo, procuraram-se vestígios das bandas de absorção do grupo acetato nos espectros de infravermelho dos sólidos em questão. Este estudo, indicou a existência de acetato na estrutura destes sólidos, não permitindo a quantificação do ião carbonato. Este resultado, está de acordo com outros obtidos por alguns investigadores [82, 83, 84].

Apesar de não se ter conseguido realizar a quantificação do CO_3^{2-} , foi possível confirmar a incorporação deste ião na estrutura dos sólidos obtidos a pH 9 (37 e 45 °C) através da determinação e comparação do valor dos seus parâmetros de rede com os da hidroxiapatite sintética (tabela 4.6).

Tabela 4.6: Parâmetros de rede da HA sintética e das amostras sintetizadas a pH 9 (37 e 45 °C), caracterizadas como HA's carbonatadas do tipo B.

Parâmetros de rede (Å)		
Identificação amostra	-a	-c
HA	9,432	6,881
151	9,399	6,885
152	9,403	6,888

A análise termogravimétrica destes sólidos (figura 4.10(a) e (b)) também revelou a presença de carbonato nas suas estruturas, através das perdas de massa verificadas entre 600 e 800 °C.



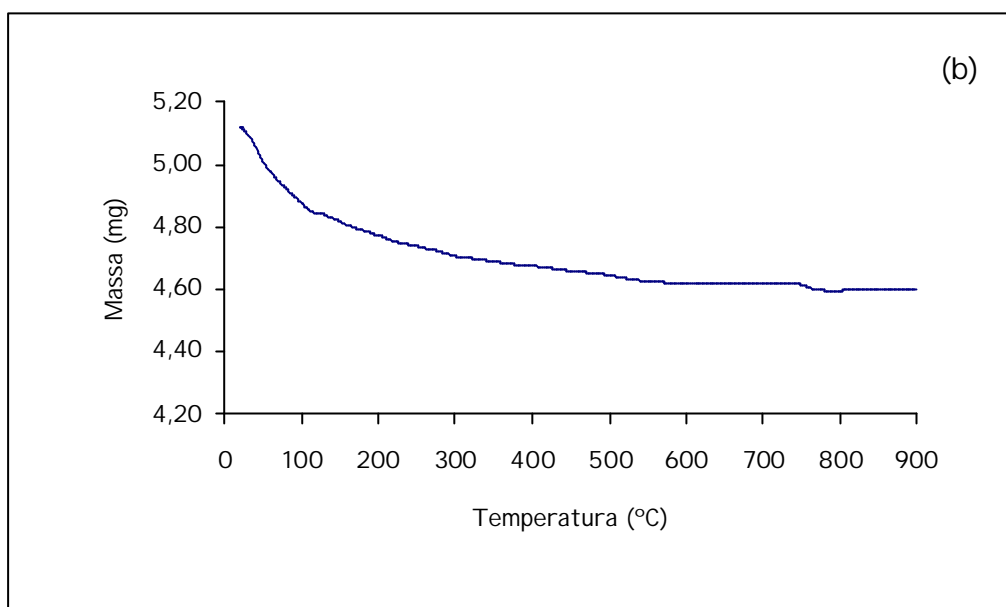


Figura 4.10: Termogramas das amostras 151 (a) e 152 (b) - HA's carbonatadas do tipo B - sintetizadas na presença do íon carbonato, respectivamente, a pH 9 (a 37 e 45 °C).

Apresenta-se na figura 4.11 uma imagem, adquirida por microscopia electrónica de varrimento do aspecto morfológico da amostra 141.

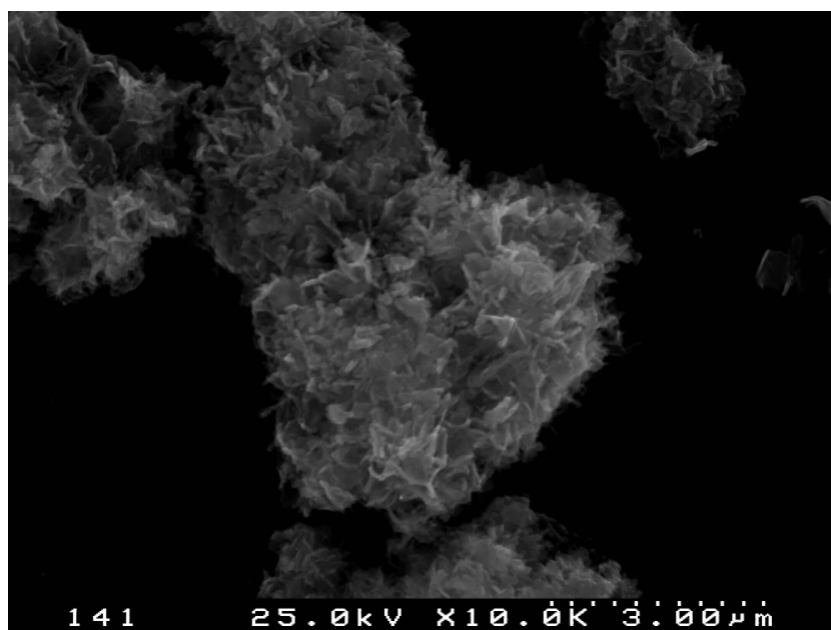


Figura 4.11: Micrografia da amostra 141 (HA carbonatada do tipo B).

4.3.2 Caracterização dos sólidos obtidos na presença dos íons Na^+ , Cl^- e CO_3^{2-}

Apresenta-se na tabela 4.7, a composição química dos sólidos obtidos na presença dos íons Na^+ , Cl^- , e CO_3^{2-} .

Tabela 4.7: Composição química dos sólidos obtidos na presença dos íons Na^+ , Cl^- e CO_3^{2-} .

pH	37 °C					45 °C				
	Ident.	Ca ^{a)}	P ^{a)}	Na ^{a)}	Ca/P	Ident.	Ca ^{a)}	P ^{a)}	Na ^{a)}	Ca/P
	am.					am.				
5,0	211	-	-	-	b)	212	-	-	-	b)
5,5	2(1.5)1	-	-	-	b)	2(1.5)2	-	-	-	b)
6,0	221	32,0	16,7	0,3	1,48	222	32,7	16,7	0,3	1,51
7,0	231	32,0	16,4	0,4	1,50	232	32,3	16,4	0,4	1,52
7,5	2(3.5)1	31,9	16,4	0,5	1,50	2(3.5)2	31,6	16,2	0,6	1,51
8,0	241	33,0	16,1	0,6	1,59	242	33,2	15,9	0,9	1,61
9,0	251	33,5	15,8	0,7	1,64	252	33,6	15,7	1,0	1,66

a) % m/m; b) Não ocorreu precipitação.

Poder-se-á observar que não ocorreu precipitação para as sínteses realizadas a pH 5,0 e 5,5, independentemente do valor da temperatura.

Os espectros de DRX dos sólidos sintetizados a valores de pH entre 6 e 7,5, para ambas as temperaturas, são idênticos aos do OCP. No entanto, estas

amostras apresentam relações Ca/P entre 1,48 e 1,52 (superiores ao valor característico do OCP puro – 1,33).

Neste caso, esta diferença poderá ter três explicações possíveis:

- 1) incorporação do ião CO_3^{2-} nos sólidos em questão e/ou;
- 2) existe uma mistura de fases (OCP+HA) nestas amostras ($\text{Ca/P}_{(\text{OCP})} \approx 1,33$ $\approx \text{Ca/P} \approx 1,50 \approx \text{Ca/P}_{(\text{HA})} \approx 1,67$) e/ou;
- 3) poderá ter ocorrido substituição de algum ião cálcio pelo sódio.

A análise dos espectros de infravermelho destes sólidos indicou a existência de bandas bem visíveis na zona característica do ião carbonato em substituições do tipo B ($\sim 1450, 1410$ e 870cm^{-1}). Com excepção destas bandas, os espectros das amostras em estudo (221, 222, 231, 232, 2(3.5)1 e 2(3.5)2), são idênticos ao espectro de infravermelho característico do OCP. A existência das bandas de absorção do grupo carbonato permite confirmar a primeira hipótese em estudo: presença do ião CO_3^{2-} nestas amostras.

Contudo, a aquisição dos difractogramas de pó dos sólidos não permitiu confirmar a existência de uma mistura OCP+HA (figura 4.12). Esta dificuldade dever-se-á, fundamentalmente, à grande semelhança dos espectros de DRX característicos do OCP e da HA (ambos apresentam os picos de maior intensidade entre $30 - 35^\circ$ (2 θ) - secções 2.5.4 e 2.7.2.3). Assim sendo, procedeu-se também neste caso à comparação dos espectros de infravermelho com os existentes na base de dados do FTIR (tabela 4.8).

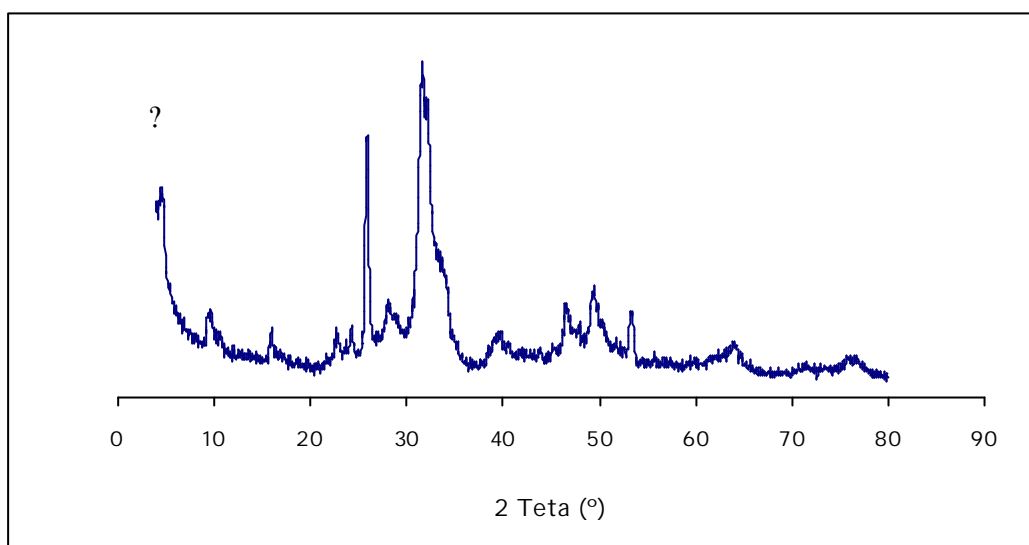


Figura 4.12: Difractograma de pós da amostra 2(3.5)1, sintetizada a pH 7,5 e 37 °C em presença dos íons Na^+ , Cl^- e CO_3^{2-} . No espectro apresentado é visível o pico mais característico (?) do OCP puro.

Tabela 4.8: Informação adquirida (informaticamente) a partir da comparação dos espectros das amostras sintetizadas entre pH = 6,0 - 7,5 (37 e 45 °C), com os espectros dos fosfatos de cálcio existentes na base de dados do FTIR.

pH	Amostra	T (°C)	Ca/P	OCP (%)	HA (%)	Grau confiança (%)
6,0	221	37	1,48	60	40	98
7,0	231	37	1,50	50	50	99
7,5	2(3.5)1	37	1,50	50	50	97
6,0	222	45	1,51	45	55	99
7,0	232	45	1,52	40	60	95
7,5	2(3.5)2	45	1,51	40	60	99

NOTA: Este programa só dá incrementos de 5%, e só considera a possibilidade de duas fases em simultâneo.

Tal como nas situações experimentais anteriormente estudadas, a análise comparativa dos espectros de IV, permitiu detectar a existência de uma mistura de fases de OCP e HA (tendo em consideração todas as limitações existentes).

Assim sendo, poder-se-á concluir que apesar de serem visíveis em todos os espectros de IV, as bandas de absorção características do OCP atribuídas ao ião HPO_4^{2-} (~ 865 e 910 cm^{-1}), poderá existir também uma percentagem de HA. Combinando esta informação, com a detecção das bandas atribuídas ao ião carbonato por FTIR, anteriormente referida, poder-se-á concluir que o OCP e a HA (eventualmente) presente nestas amostras apresentarão o mesmo tipo de substituição que as HA's obtidas a pH 8 e 9 em presença do ião CO_3^{2-} : possível substituição do grupo PO_4^{3-} pelo grupo CO_3^{2-} , característica das HA's carbonatadas do tipo B. Segundo Graham e Brown [64] os iões substituintes uma vez incorporados na estrutura do OCP, serão subsequentemente incorporados, durante a conversão, na HA.

Por fim, se se relacionar tudo isto com o facto da análise química destas amostras ter revelado a presença de uma percentagem (ainda que reduzida) de sódio (ver tabela 4.7), poder-se-á afirmar o aumento dos seus valores da relação molar Ca/P dever-se-á, provavelmente, à combinação das três hipóteses inicialmente mencionadas.

O facto destas amostras apresentarem espectros de IV com bandas de absorção (bem definidas) características do grupo carbonato e uma cristalinidade reduzida (visível pelos difractogramas de pó), permite concluir que a quantidade de carbonato incorporada na estrutura destes materiais será maior que a quantidade deste ião presente nos sólidos sintetizados na secção 4.3.1, nas mesmas condições de temperatura e pH. Este aumento, da quantidade de CO_3^{2-} incorporado, poderá ser explicado pela incorporação simultânea do ião Na^+ ,

conforme descrito na secção 2.7.3.2 e de acordo com os resultados obtidos por outros autores [39, 43-45].

As micrografias de SEM destas amostras mostraram a existência de sólidos menos cristalinos do que os estudados na secção 4.3.1 (nas mesmas condições de pH e temperatura). Esta diminuição de cristalinidade está de acordo com tudo o que foi anteriormente referido. A análise de EDS indicou a presença em todas estas amostras dos iões cálcio, fósforo e sódio.

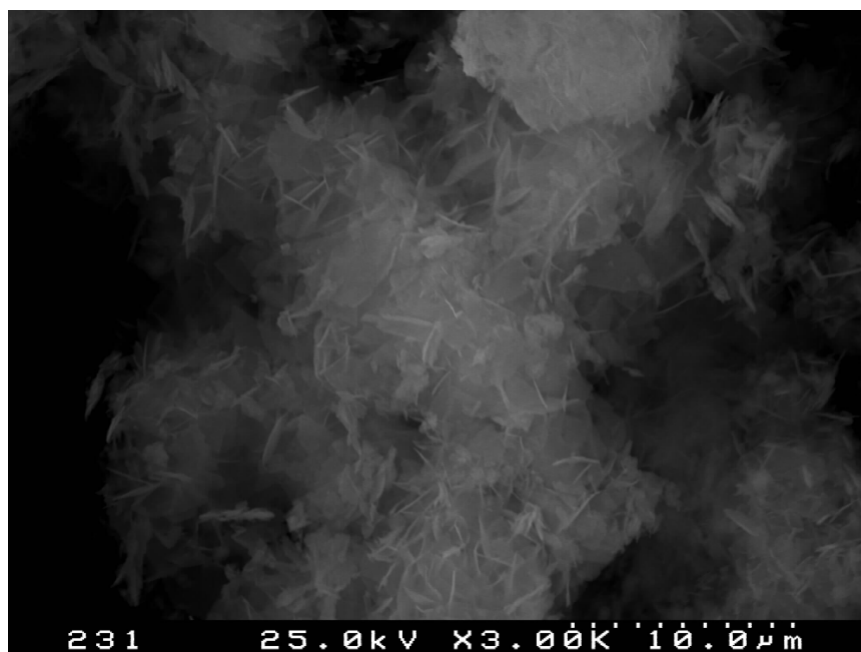


Figura 4.13: Imagem de SEM da amostra 231, obtida a pH 7 e 37 °C, em presença dos iões carbonato, sódio e cloreto.

A análise por espectroscopia de infravermelho dos sólidos 241, 242, 251 e 252 também revelou a presença do ião carbonato. Apesar de serem visíveis, em todos os espectros, as bandas de absorção características do grupo CO_3^{2-} (~ 1450,

1410 e 870 cm^{-1}), elas são mais evidentes nos sólidos sintetizados a pH 9. Poder-se-á verificar (tabela 4.7), que o aumento do pH do meio conduz a uma diminuição das percentagens de fósforo e cálcio, acompanhadas por um aumento do Na incorporado nestes mesmos sólidos. Uma vez mais, a diminuição da percentagem do fósforo poderá ser explicada pela substituição do grupo PO_4^{3-} pelo grupo CO_3^{2-} (confirmada pelos espectros de FTIR), enquanto que o facto de existir uma relação linear entre as percentagens dos iões Ca e Na, permite concluir que estes dois iões competem entre si para ocupar o mesmo local na rede.

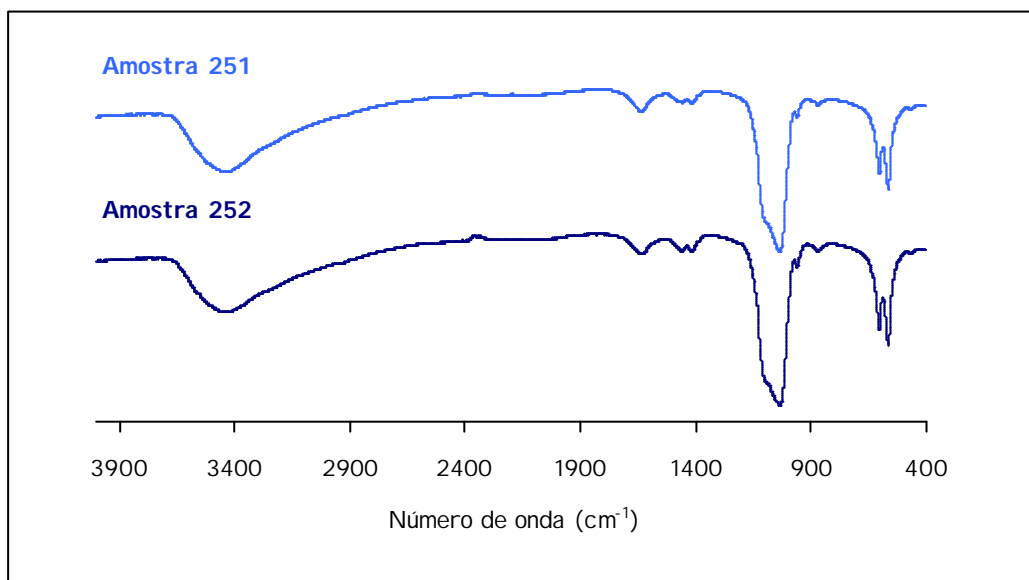


Figura 4.14: Espectros de FTIR das amostras 251 e 252, sintetizadas a pH 9 e a, respectivamente, 37 e 45 °C.

A determinação dos parâmetros de rede do sólido 251 permitiu, uma vez mais confirmar a incorporação do ião carbonato na sua estrutura. Comparando o valor dos parâmetros de rede das amostras 151 (tabela 4.6) e 251 (tabela 4.9), sintetizadas nas mesmas condições de temperatura e pH, poder-se-á verificar que a extensão da incorporação do ião carbonato é influenciada pela incorporação simultânea de sódio (de acordo com o exposto na secção 2.7.3.2).

Tabela 4.9: Parâmetros de rede da HA sintética e da amostra sintetizada a pH 9 e 37 °C.

Identificação amostra	Parâmetros de rede (Å)	
	-a	-c
HA	9,432	6,881
251	9,364	6,889

A observação, por SEM, destes sólidos mostrou existir uma diminuição da cristalinidade, em relação aos sólidos da secção 4.3.1. Esta diminuição de cristalinidade, também confirmada pelos espectros de difracção de raios X, está de acordo com o facto dos sólidos 241, 242, 251 e 252 apresentarem na sua estrutura uma maior quantidade de carbonato (confirmada pela determinação dos parâmetros de rede).

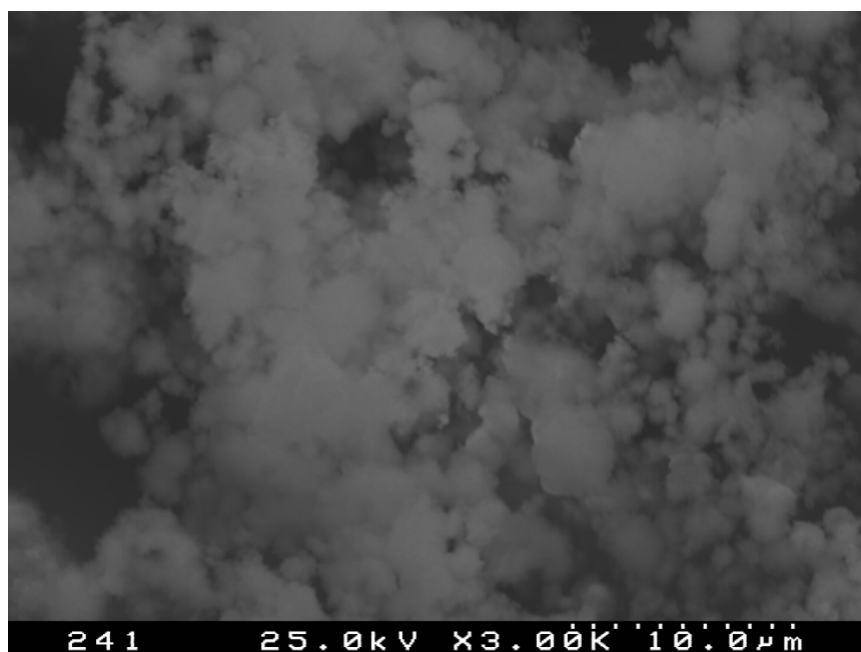
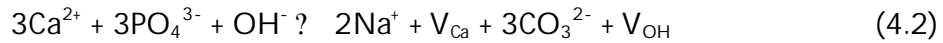


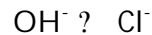
Figura 4.15: Aspecto morfológico da amostra 241, sintetizada a pH 8 e 37 °C, sendo visível uma diminuição de cristalinidade em relação à amostra 141 (figura 4.11).

Bonel *et al.* [68] indicam que durante a precipitação da hidroxiapatite em presença do ião sódio, o grupo CO_3^{2-} pode substituir o grupo PO_4^{3-} de acordo com a equação:



No entanto, este não parece ser o modelo para os sólidos em estudo. Analisando, uma vez mais, a tabela 4.7 poder-se-á verificar que a soma das percentagens dos iões cálcio e sódio presentes nas amostras 241, 242, 251 e 252, conduzem a valores idênticos à quantidade de cálcio presente nos sólidos 141, 142, 151 e 152. Este facto indicia uma substituição básica do tipo A (secção 2.7.4), para o ião cálcio (sem formação de lacunas na sua sub-rede).

O facto do ião Cl^- estar presente em solução, poderia conduzir a uma incorporação (parcial) deste ião na estrutura dos sólidos em questão, de acordo com a substituição básica (G):



No entanto, não foi detectada a presença de cloretos em nenhuma destas amostras. A análise de EDS apenas detectou a presença de cálcio, sódio e fósforo. Recorde-se que a substituição do ião OH^- pelo Cl^- alteraria o valor dos parâmetros de rede (tabela 2.2) e a determinação dos valores destes mesmos parâmetros, indicou apenas a incorporação do ião carbonato.

4.3.3 Caracterização dos sólidos obtidos na presença de Na^+ , K^+ , Cl^- e CO_3^{2-}

Apresenta-se nas tabelas 4.10(a) e (b), a composição química dos sólidos obtidos na presença dos íons sódio, potássio, cloreto e carbonato a 37 e 45 °C.

Tabela 4.10 (a): Composição química dos sólidos obtidos a 37 °C, na presença dos íons Na^+ , K^+ , Cl^- e CO_3^{2-} .

pH	Ident. amostra	Ca ^{a)}	P ^{a)}	Na ^{a)}	K ^{a)}	Ca/P
5,0	311	-	-	-	-	b)
5,5	3(1.5)1	-	-	-	-	b)
6,0	321	31,9	16,4	0,5	0,04	1,51
7,0	331	31,7	16,2	0,5	0,03	1,51
8,0	341	32,9	15,9	0,9	0,02	1,60
9,0	351	33,1	15,7	1,0	0,02	1,63

a) % m/m; b) Não ocorreu precipitação.

Tabela 4.10 (b): Composição química dos sólidos obtidos a 45 °C, na presença dos íons Na^+ , K^+ , Cl^- e CO_3^{2-} .

pH	Ident. amostra	Ca ^{a)}	P ^{a)}	Na ^{a)}	K ^{a)}	Ca/P
5,0	312	-	-	-	-	b)
5,5	3(1.5)2	-	-	-	-	b)
6,0	322	32,0	16,5	0,5	0,04	1,50
7,0	332	32,0	16,4	0,6	0,05	1,51
8,0	342	32,9	15,9	1,0	0,02	1,60
9,0	352	33,4	15,6	1,1	< 0,02	1,65

a) % m/m; b) Não ocorreu precipitação.

A análise dos espectros de DRX e FTIR das amostras sintetizadas a pH 6 e 7 (37 e 45 °C), conduziu a resultados idênticos aos que foram apresentados para os sólidos estudados na secção anterior (sintetizados nas mesmas condições de pH e temperatura). No entanto, a comparação dos espectros de infravermelho destas amostras com os espectros da base de dados do FTIR não se mostrou tão eficiente (menor grau de confiança) como para as duas situações experimentais anteriormente estudadas - tabela 4.11.

Tabela 4.11: Informação adquirida informaticamente a partir da comparação dos espectros das amostras sintetizadas entre pH = 6,0 - 7,0 (37 e 45 °C), com os espectros dos fosfatos de cálcio existentes na base de dados do FTIR.

pH	Amostra	T (°C)	Ca/P	OCP (%)	HA (%)	Grau confiança (%)
6,0	321	37	1,51	45	55	99
7,0	331	37	1,51	50	50	82
6,0	322	45	1,50	55	45	86
7,0	332	45	1,51	45	55	24

NOTA: Este programa só dá incrementos de 5%. e só considera a possibilidade de duas fases em simultâneo.

A explicação para a diminuição dos graus de confiança, poderá ser dada pelo facto de os fosfatos de cálcio que constituem a base de dados do aparelho de infravermelho não apresentarem muitas substituições iónicas. Deste modo, os resultados deixarão de fazer sentido à medida que aumenta o número de iões substituintes e a extensão da substituição. A análise química destas amostras revelou a presença de cálcio, sódio, potássio e fósforo - tabelas 4.10(a) e (b).

A observação, por microscopia electrónica de varrimento, da morfologia destas amostras não revelou uma morfologia diferente da que é apresentada pelos sólidos anteriormente estudados (nas mesmas condições de pH e temperatura). A análise de EDS revelou a presença de cálcio, sódio, potássio e fósforo em todas as amostras.

Os espectros de infravermelho e de difracção de raios X dos sólidos 341, 342, 351 e 352 são em tudo idênticos aos das amostras obtidas nas mesmas condições de pH e temperatura, em presença e ausência dos iões sódio e cloreto.

A análise, por microscopia electrónica, da morfologia apresentada por estas amostras também não mostrou alterações em relação aos sólidos estudados nas secções 4.3.1 e 4.3.2.

A análise de EDS revelou a existência de iões cloreto na estrutura destes sólidos. A incorporação deste ião, também foi confirmada após determinação dos valores dos parâmetros de rede das amostras 351 e 352 (tabela 4.11).

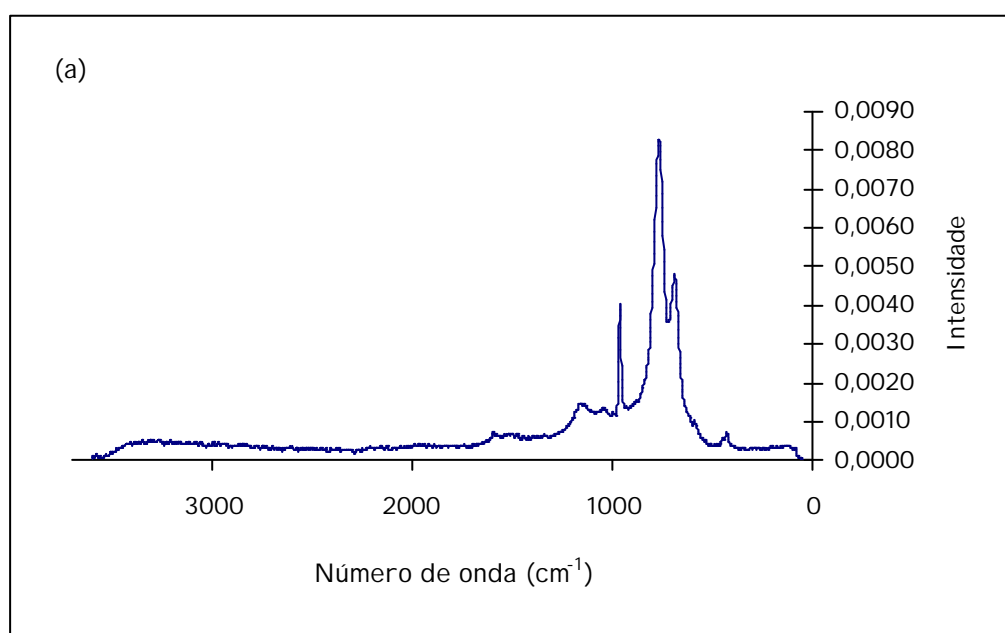
Tabela 4.11: Parâmetros de rede da HA sintética e das amostras sintetizadas a pH 9 (37 e 45 °C).

Parâmetros de rede (Å)		
Identificação amostra	-a	-c
HA	9,432	6,881
351	9,436	6,873
352	9,466	6,866

O facto de o ião potássio ser incorporado na estrutura destes sólidos em quantidades vestigiais (em média cerca de 0,04%) poderá ser explicado com base nos raios iónicos dos iões Ca^+ , Na^+ e K^+ (secção 2.7.3.4).

4.4 ESPECTROS DE FT-RAMAN DE ALGUNS DOS SÓLIDOS OBTIDOS

Tal como foi anteriormente referido na secção 2.7.5, o espectro de FT-Raman característico da HA sintética, poderá sofrer alterações consoante a natureza dos iões substituintes. Este facto, foi confirmado quando se procedeu à aquisição dos espectros de FT-Raman das amostras sintetizadas a pH 9 e 37 °C, na presença e ausência dos diferentes iões em estudo - figura 4.16(a), (b) e (c). Estes sólidos foram todos caracterizados como HA's carbonatadas do tipo-B no entanto, as amostras 251 e 251 apresentam substituições iónicas (sódio e/ou potássio) nas posições do ião cálcio.



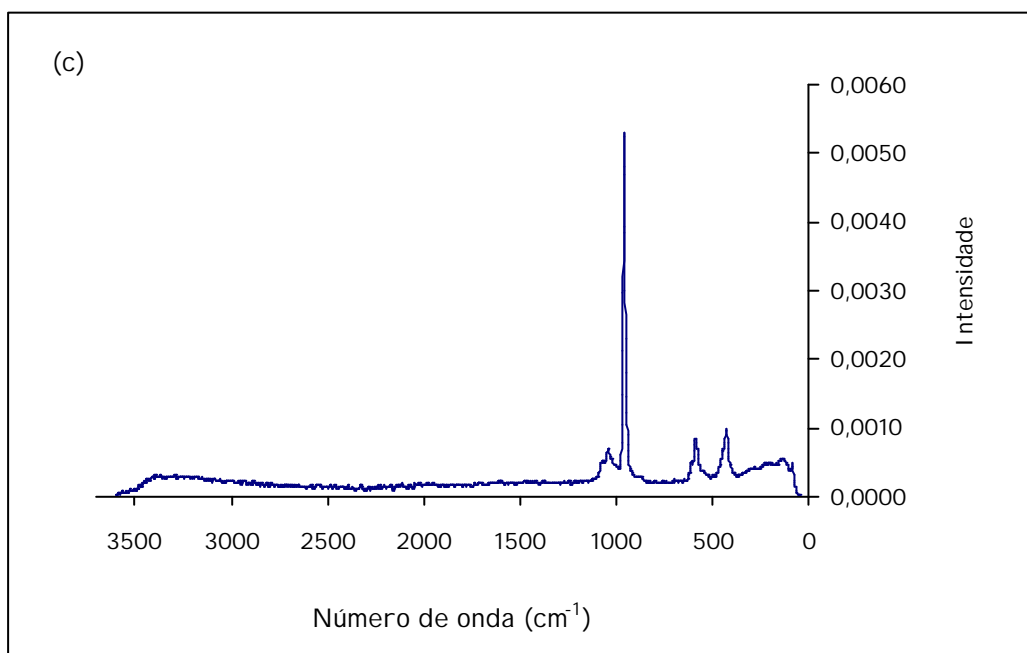
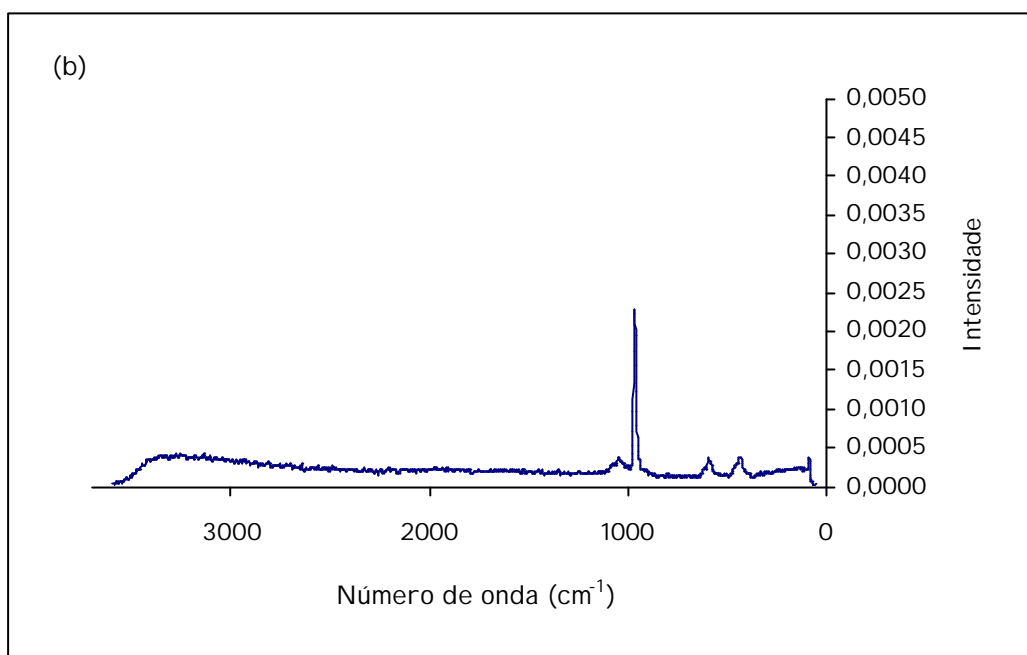


Figura 4.16: Espectros de FT-Raman das amostras 151 **(a)**, 251 **(b)** e 351 **(c)**.

4.5 CONCLUSÕES

Considerando tudo o foi anteriormente exposto, poder-se-á de um modo geral concluir que a composição inicial do meio e a temperatura de síntese têm influência na natureza das fases cristalinas obtidas.

Assim sendo, poder-se-ão apresentar, de forma esquemática, as principais conclusões retiradas do trabalho experimental apresentado ao longo deste capítulo:

- ? A presença do ião carbonato parece inibir a formação do DCPD e do OCP, favorecendo a formação de HA's carbonatadas;
- ? O aumento da temperatura de síntese, nas condições experimentais estudadas, desloca o domínio de cristalização da HA para valores mais baixos de pH;
- ? O aumento do pH e da temperatura de síntese promovem a formação de hidroxiapatites mais estequiométrias;
- ? A composição inicial do meio altera a composição química e consequentemente, os parâmetros de rede dos sólidos obtidos.

5. ENVELHECIMENTO EM SBF DE ALGUNS DOS FOSFATOS DE CÁLCIO SINTETIZADOS

5.1 INTRODUÇÃO

As experiências de envelhecimento discutidas nesta segunda parte da dissertação, tiveram como objectivo o estudo das transformações *in vitro* do DCPD, OCP e HA - importantes para a compreensão dos processos de integração e reconstituição óssea, característicos dos tecidos calcificados.

Como referido anteriormente, os estudos *in vitro* deverão ser realizados em condições com interesse biológico ou seja, semelhantes às existentes no plasma humano (tabela 5.1). Deste modo, alguns dos sólidos inicialmente sintetizados (capítulo 4) foram imersos numa solução de um fluido fisiológico simulado (SBF), com um pH inicial de $7,40 \pm 0,01$ e deixados a envelhecer durante diferentes períodos de tempo à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabela 5.1: Concentração (mM) dos iões no plasma humano e em SBF*.

Ião	SBF	Plasma humano
Na^+	142,0	142,0
K^+	5,0	5,0
Mg^{2+}	1,5	1,5
Ca^{2+}	2,5	2,5
Cl^-	147,8	103,0
HCO_3^-	4,2	27,0
HPO_4^{2-}	1,0	1,0
SO_4^{2-}	0,5	0,5

Adaptação da tabela 1, ref. [81] p.332.

5.2 MÉTODO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Descreve-se de seguida, o método e as condições experimentais utilizadas no decorrer das experiências de envelhecimento de alguns dos sólidos sintetizados.

Inicialmente, prepararam-se 1000 cm³ de uma solução de SBF por adição dos reagentes apresentados na tabela 5.2 (na secção 3.3.1 são apresentados os fornecedores destes mesmos reagentes). Depois de preparada, a solução foi devidamente rotulada e armazenada a baixa temperatura (cerca de 0 °C).

Tabela 5.2: Procedimento e reagentes usados na preparação da solução de SBF*.

Ordem	Reagente	Quantidade
1	NaCl	7,996g
2	NaHCO ₃	0,350g
3	KCl	0,224g
4	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,228g
5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,305g
6	HCl (1M)	40mL (aproximadamente 90% do total)
7	CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,548g
8	Na ₂ SO ₄	0,071g
9	NH ₂ C (CH ₂ OH) ₃	6,057g

* Adaptação da tabela 2, ref. [10] p.332.

Seleccionaram-se os sólidos a envelhecer (de entre todos os que foram sintetizados a 37 °C), bem como os tempos de envelhecimento a estudar (tabelas 5.3 e 5.4). Para melhor compreensão da escolha realizada, são apresentadas as condições de síntese de cada um dos sólidos sujeitos às experiências de envelhecimento.

Tabela 5.3: Sólidos seleccionados para as experiências de envelhecimento.

Sólidos sintetizados ao ar (em presença do ião CO_3^{2-}), a 37°C						
Sem adição de iões estranhos			NaCl (0,147 mol. dm^{-3})		NaCl (0,142 mol. dm^{-3}) + KCl (0,005 mol. dm^{-3})	
pH	Fase Principal	Identif. da amostra	Fase	Identif. da amostra	Fase	Identif. da amostra
6,0	DCPD	121r	-	-	-	-
7,0	OCP	131	OCP	231	OCP	331
9,0	HA	151	HA	251	HA	351

Pesaram-se amostras com cerca de 50 mg de cada uma das fases de fosfato a estudar, para cada tempo de envelhecimento estabelecido, e adicionaram-se-lhes 10 mL da solução de SBF previamente preparada. Deste modo, obtiveram-se cerca de 10 suspensões (de SBF+amostra) para cada um dos sólidos seleccionados. Uma vez que a quantidade disponível de cada sólido era de facto reduzida, não foram realizadas réplicas. Depois de preparadas, as soluções de SBF+amostra foram deixadas a envelhecer numa estufa a 37 °C, com um pH inicial de 7,40 \pm 0,05 e durante os períodos de tempo já mencionados.

Tabela 5.4: Tempos de envelhecimento inicialmente estabelecidos.

t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6	t_7	t_8
15 minutos	30 minutos	1 hora	3 horas	5 horas	1dia	3 dias	10 dias

No final dos envelhecimentos as amostras foram retiradas da estufa, as soluções resultantes foram filtradas e procedeu-se à leitura do seu valor de pH e das concentrações de cálcio, fósforo, sódio e potássio, por ICP. Por fim, os sólidos obtidos foram secos numa estufa a aproximadamente 20 °C e caracterizados por difracção de raios X, espectroscopia de infravermelho, microscopia electrónica de varrimento e foi realizada a sua microanálise por raios X (EDS).

5.3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

5.3.1 Caracterização dos sólidos resultantes. Evolução do pH e das concentrações dos iões cálcio e fósforo presentes na solução de SBF

5.3.1.1 Sólido sem iões substituintes (caracterizado como sendo maioritariamente DCPD)

A análise da evolução dos espectros de raios X (figura 5.1) e de infravermelho da amostra 121r, no decorrer das experiências de envelhecimento, mostrou que depois de 1 hora em SBF não é visível qualquer alteração significativa nos difractogramas de pós adquiridos. Contudo, o espectro do sólido envelhecido durante 5 horas revela o aparecimento de um dos picos mais característicos do OCP – secção 2.5.4). Ao fim de 1 dia de envelhecimento, é perfeitamente visível a coexistência de duas fases (DCPD e OCP). O sólido obtido depois de 3 dias de envelhecimento, apresenta um difractograma de pós semelhante ao do OCP. No entanto, ainda são visíveis alguns dos picos de DRX característicos do DCPD. Após 10 dias em SBF, observa-se apenas a presença de uma única fase do tipo OCP.

As alterações acima mencionadas, indiciam que durante o envelhecimento em SBF ocorreu uma transformação de fase DCPD? OCP.

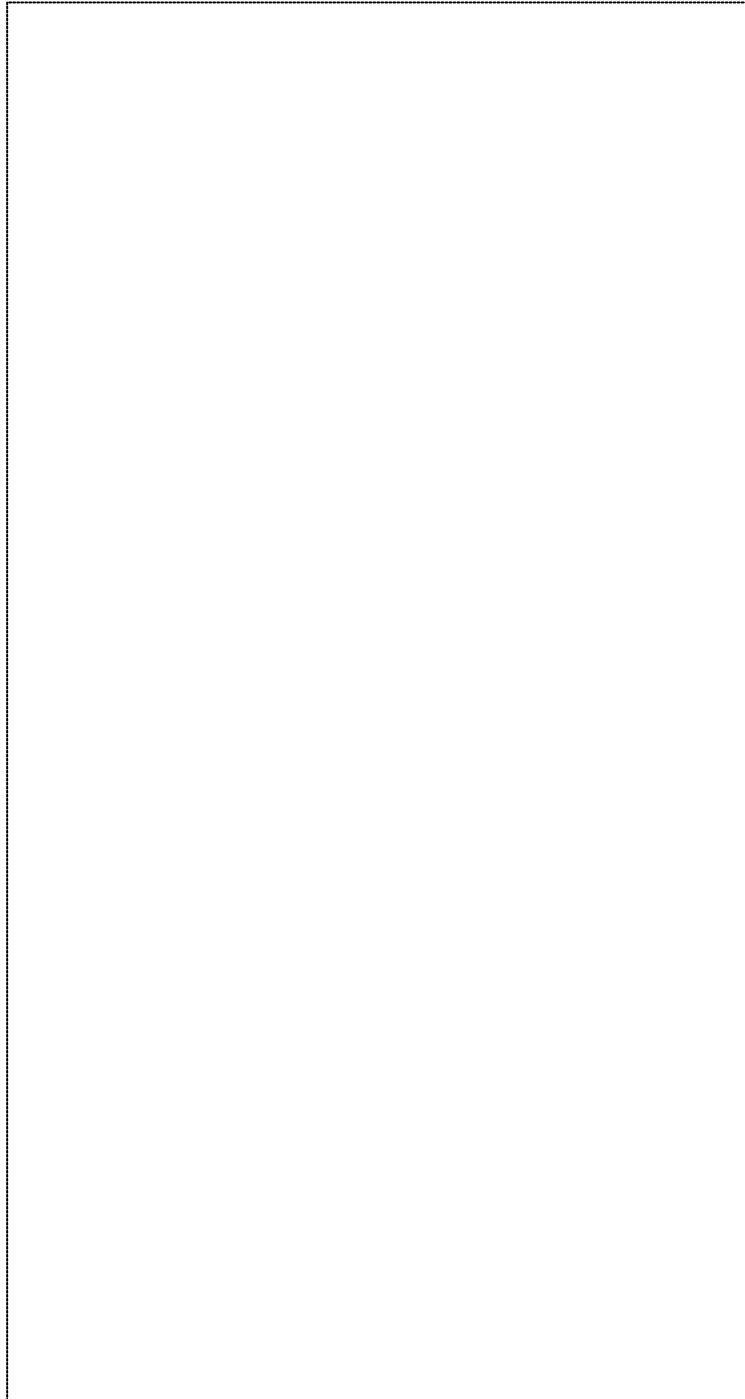
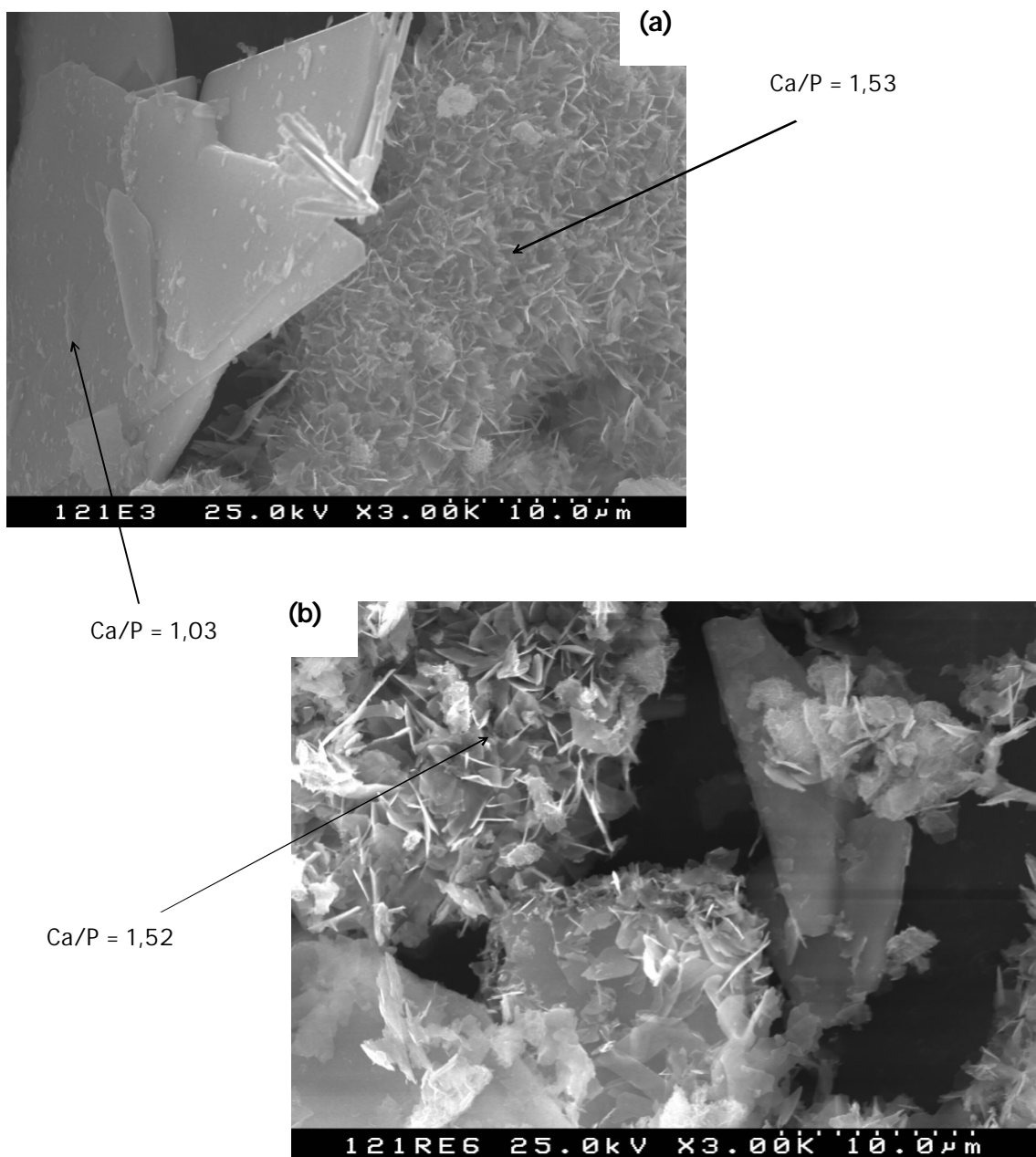


Figura 5.1: Evolução dos espectros de DRX da amostra 121r, ao longo do envelhecimento em SBF.

As imagens obtidas por microscopia electrónica de varrimento, mostram uma alteração morfológica dos cristais no decorrer do envelhecimento - figura 5.2(a), (b) e (c). Esta alteração da morfologia dos sólidos envelhecidos, confirma a possibilidade de ter ocorrido uma transformação do DCPD em OCP. Poder-se-á mesmo afirmar que a análise destas imagens de SEM, questiona a formação de uma terceira fase pouco cristalina (HA), ao longo do processo de envelhecimento.



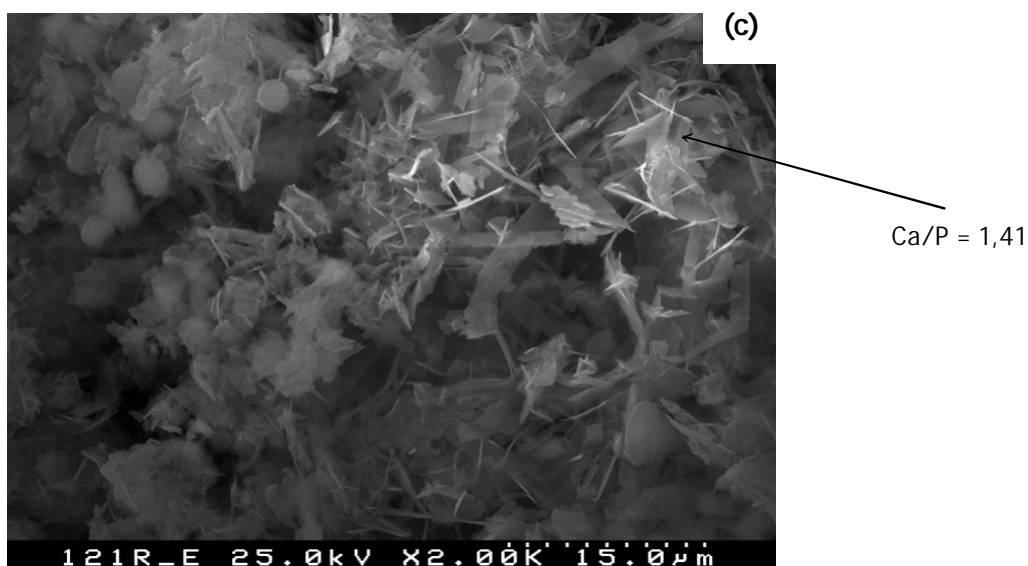


Figura 5.2: Imagem de SEM do sólido 121r ao fim de 1 hora **(a)**, 1 dia **(b)** e 10 dias **(c)**, em SBF. Os valores da relação molar Ca/P foram obtidos por EDS.

A determinação dos parâmetros de rede (tabela 5.5) dos sólidos obtidos após um tempo de envelhecimento relativamente curto e o tempo mais longo, também permitiu confirmar a ocorrência da transformação DCPD? OCP. No início do envelhecimento (30 minutos), a amostra em estudo apresenta uma estrutura monoclinica com parâmetros de rede semelhantes aos do DCPD puro (secção 2.4.2). Ao fim de 10 dias em SBF, apresenta uma estrutura triclinica com parâmetros de rede idênticos aos do OCP (secção 2.5.2).

Tabela 5.5: Evolução dos parâmetros de rede da amostra 121r ao longo do envelhecimento em SBF.

Parâmetros de rede (Å)				
Tempo envelhecimento	-a	-b	-c	Estrutura cristalina
30 minutos	6,517	15,068	5,995	Monoclinica
10 dias	19,183	9,625	6,878	Triclinica

Por fim, realizou-se a análise de EDS dos sólidos envelhecidos durante 1 e 24 horas (os mesmos da figura 5.2 (a) e (b)). Esta análise, revelou a presença nestes mesmos sólidos de sódio, potássio e cloreto, para além do cálcio e fósforo. Este resultado parece indicar que ao longo do envelhecimento poderá ocorrer uma transformação do tipo DCPD? OCP? HA (com substituições de Na^+ , K^+ e Cl^-). Recorde-se que as imagens de SEM adquiridas já colocavam a hipótese de existir, nestas amostras, uma 3ª fase pouco cristalina.

Observando os valores da relação molar Ca/P desta amostra, envelhecida durante 1 e 10 dias, verifica-se que diminui. Esta variação poderá ser atribuída ao aumento, ao longo do envelhecimento, da incorporação dos iões sódio e potássio (para as posições do cálcio), confirmada por EDS.

A possível transformação OCP? HA (com substituições) está de acordo com os estudos realizados por Tomazic *et al.* [3], sobre a hidrólise do OCP em diferentes meios. Este autor, verifica que é possível que ocorra incorporação dos iões presentes no meio (tais como CO_3^{2-} , Mg^{2+} , F^- , K^+ e Na^+) na estrutura dos sólidos obtidos.

Para além da caracterização dos sólidos envelhecidos, também se efectuou o estudo da variação do valor de pH e das concentrações de cálcio e fósforo, da solução de SBF, ao longo de todo o envelhecimento (figura 5.3). Este estudo, permitiu concluir que terá havido dissolução da fase inicialmente presente (DCPD), seguida de reprecipitação de outra fase (OCP).

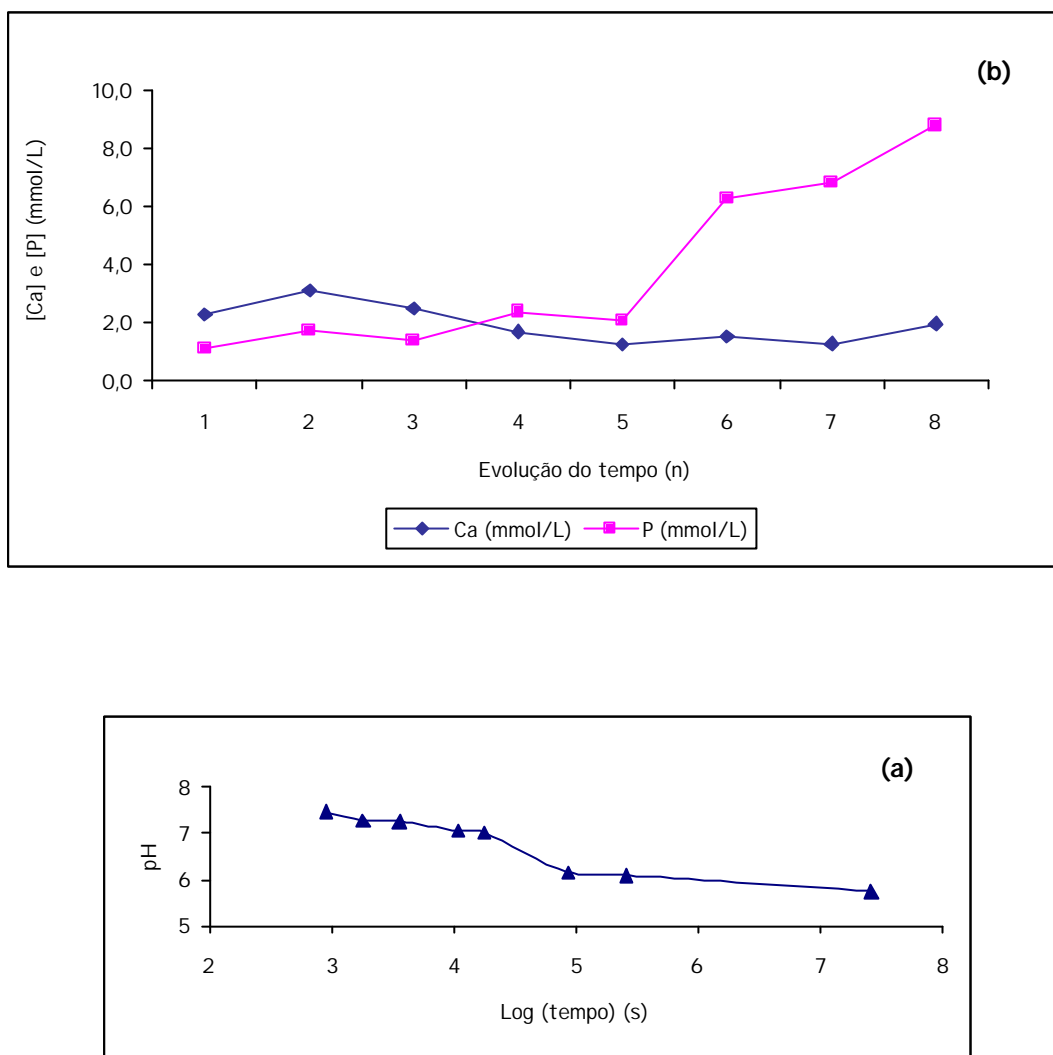


Figura 5.3: Evolução do pH (a) e da concentração de cálcio e fósforo (b), presentes na solução de SBF, ao longo do envelhecimento da amostra 121R.

5.3.1.2 Sólidos com e sem substituições de CO_3^{2-} , Na^+ , K^+ e Cl^- (caracterizados como sendo maioritariamente OCP)

Ao contrário do que foi constatado para a amostra anteriormente estudada, não é perfeitamente visível, pela análise dos espectros DRX e de IV, a existência de uma transformação de fase nas amostras 131 (figura 5.4), 231 e 331 após 10 dias de envelhecimento em SBF.

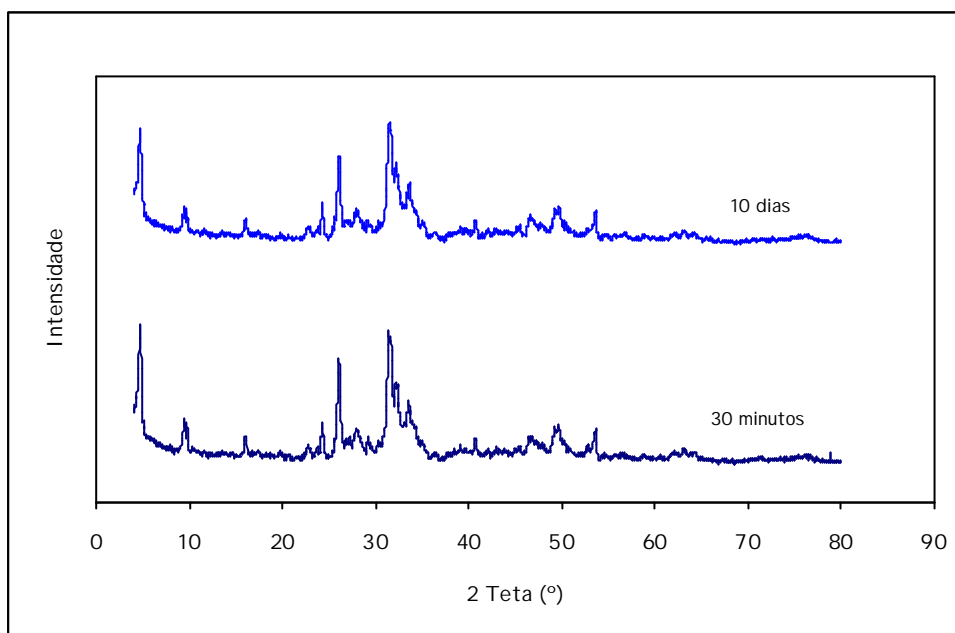


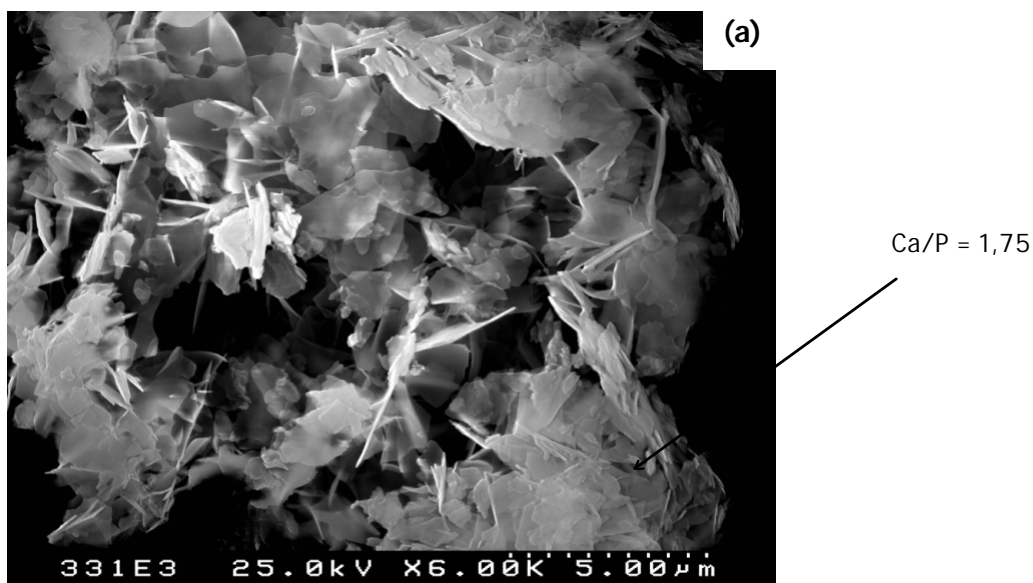
Figura 5.4: Espectro de raios X da amostra 131 ao fim de 30 minutos e de 10 dias de envelhecimento em SBF.

Antes de prosseguir, convém voltar a recordar que existe uma grande semelhança entre os espectros de raios X do OCP e da HA (os picos de maior intensidade encontram-se exactamente na mesma região – secções 2.5.4 e 2.7.2.3). Este facto, torna extremamente difícil a identificação de misturas destas duas fases, por esta técnica experimental.

No entanto, quando se procedeu à determinação dos parâmetros de rede verificou-se que quando se utilizavam, em simultâneo, as fichas do OCP e da HA, o software identificava alguns dos picos de menor intensidade como sendo HA, sendo perfeitamente visível que a quantidade destes picos aumentava à medida que aumentava o tempo de envelhecimento. No entanto, apesar de identificar a presença de duas fases, o software em questão, não conseguiu determinar os parâmetros de rede quando eram seleccionados em simultâneo picos atribuídos ao OCP e à HA. A única informação que o aparelho fornece, nestas condições, é o tipo

de estrutura cristalina. Deste modo, foi identificada a presença de uma estrutura triclinica (o pico de maior intensidade fazia parte do conjunto de picos seleccionados e tinha sido atribuído ao OCP).

Tendo isto em consideração a exposição anteriormente realizada, poder-se-á afirmar que não é de excluir uma transformação parcial de OCP? HA. Apesar de não se ter observado alteração significativa dos espectros de raios X e infravermelho destes sólidos. Também no estudo anteriormente referido [3], acerca da incorporação dos iões presentes no meio pelos sólidos resultantes da hidrólise do OCP, é referido que em todos os tempos estudados (1h, 1dia e 5dias) é visível a banda de absorção característica do OCP ($\sim 910\text{ cm}^{-1}$). No entanto, é observada neste mesmo estudo a alteração morfológica do OCP depois de hidrolizado. As imagens apresentadas, mostram sólidos com morfologia bastante idêntica à do sólido da figura 5.5(a) e (b).



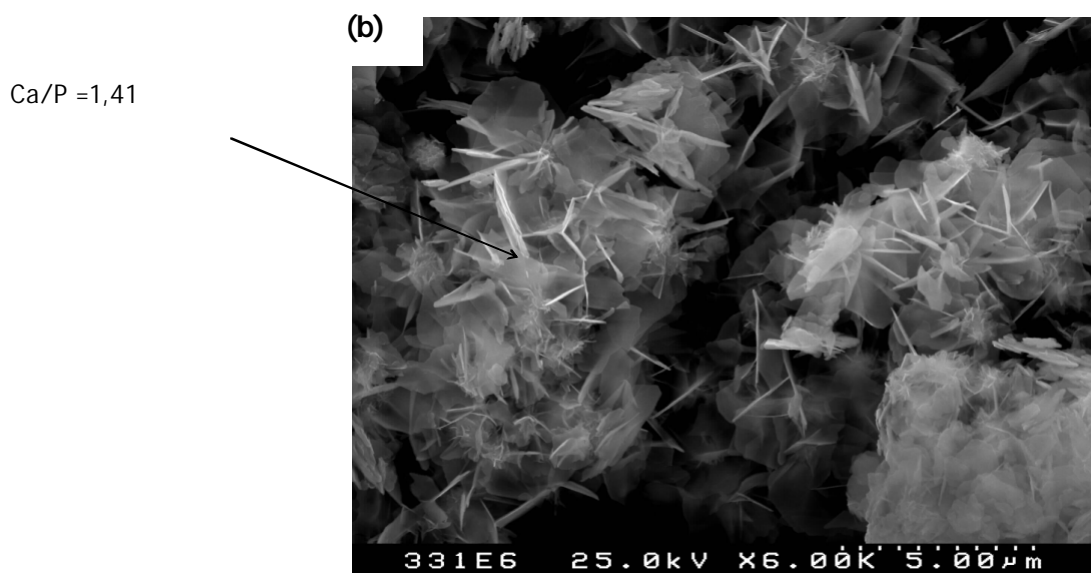


Figura 5.5: Imagem de SEM da amostra 331, envelhecida durante 1 hora **(a)** e 1 dia **(b)** em SBF. Os valores da relação molar Ca/P foram obtidos por EDS.

A análise de EDS da amostra 331 envelhecida durante 1 e 24 horas, revelou a presença de sódio, potássio, cloreto e magnésio (para além de cálcio e fósforo). Sabendo que esta amostra antes de envelhecida não continha o ião magnésio, poder-se-á concluir que a proveniência deste ião será a própria solução de SBF (ver tabela 5.2).

Neste caso, também se procedeu ao acompanhamento da evolução do pH e das concentrações de cálcio e fósforo presentes na solução de SBF, ao longo do envelhecimento (figura 5.6).

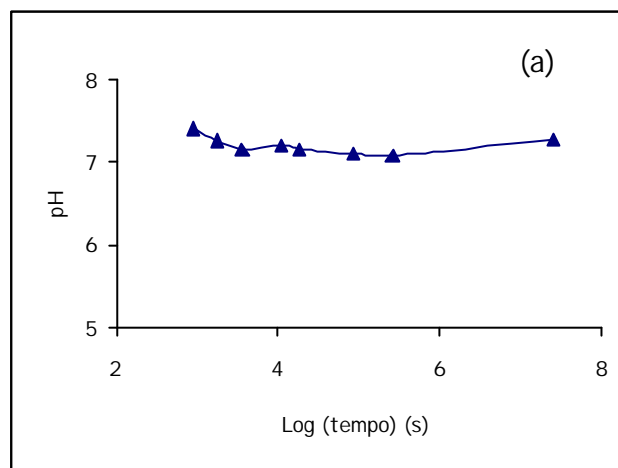
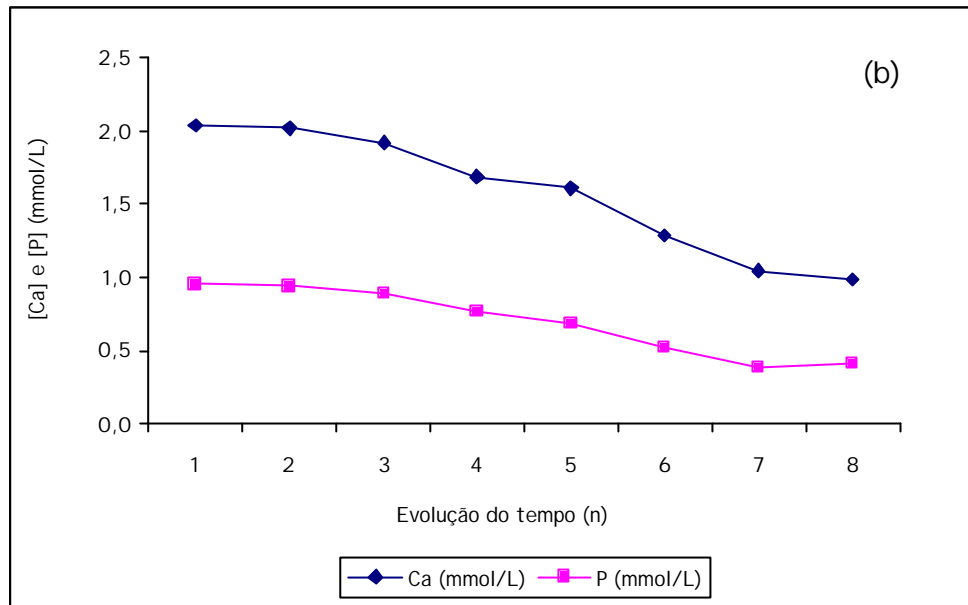


Figura 5.6: Evolução do pH **(a)** e da concentração de cálcio e fósforo **(b)**, presentes na solução de SBF, ao longo do envelhecimento das amostras 131, 231 e 331.

A análise da evolução da concentração do íon cálcio em solução, permite afirmar que houve unicamente reprecipitação da fase inicialmente presente.

5.3.1.3 Sólidos com e sem substituições de CO_3^{2-} , Na^+ , K^+ e Cl^- (caracterizados como sendo HA)

A análise dos espectros de infravermelho e de DRX (figura 5.7) das amostras 151, 251 e 351 também não evidenciou qualquer alteração de fase, no decurso das experiências de envelhecimento.

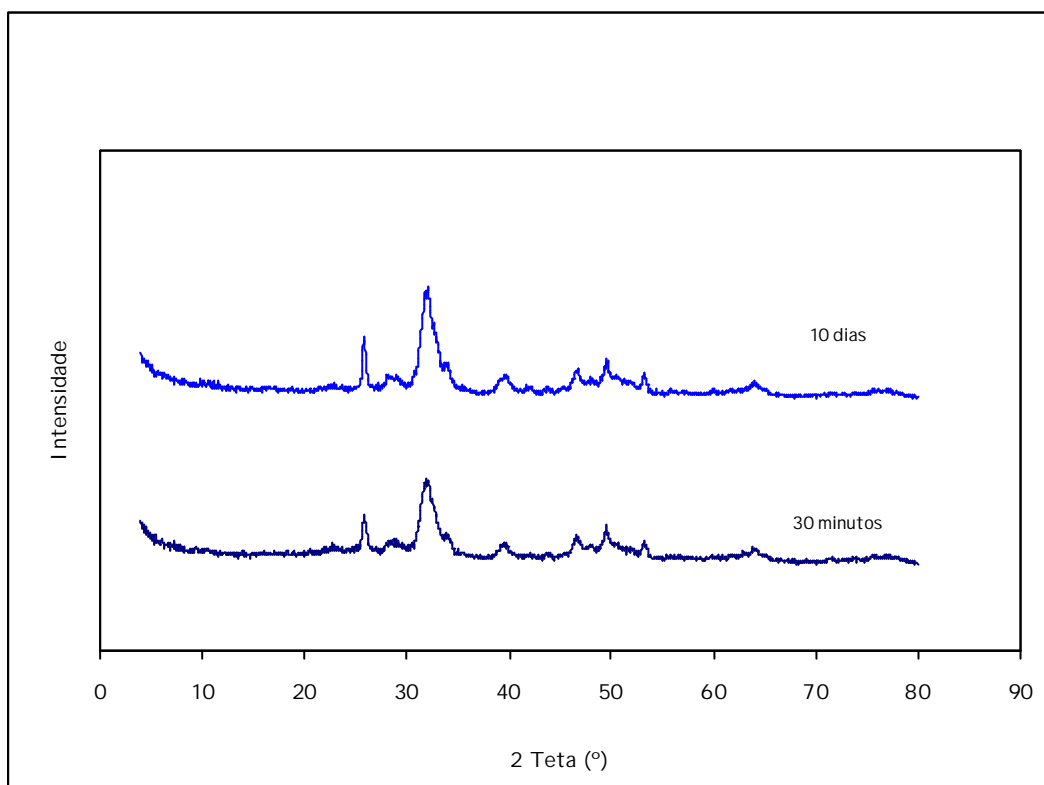


Figura 5.7: Difractograma de pó da amostra 151 no início e no fim do envelhecimento em SBF.

Na figura 5.8(a) e (b) é possível observar o aspecto morfológico do sólido 351 após 1 e 24 horas de envelhecimento.

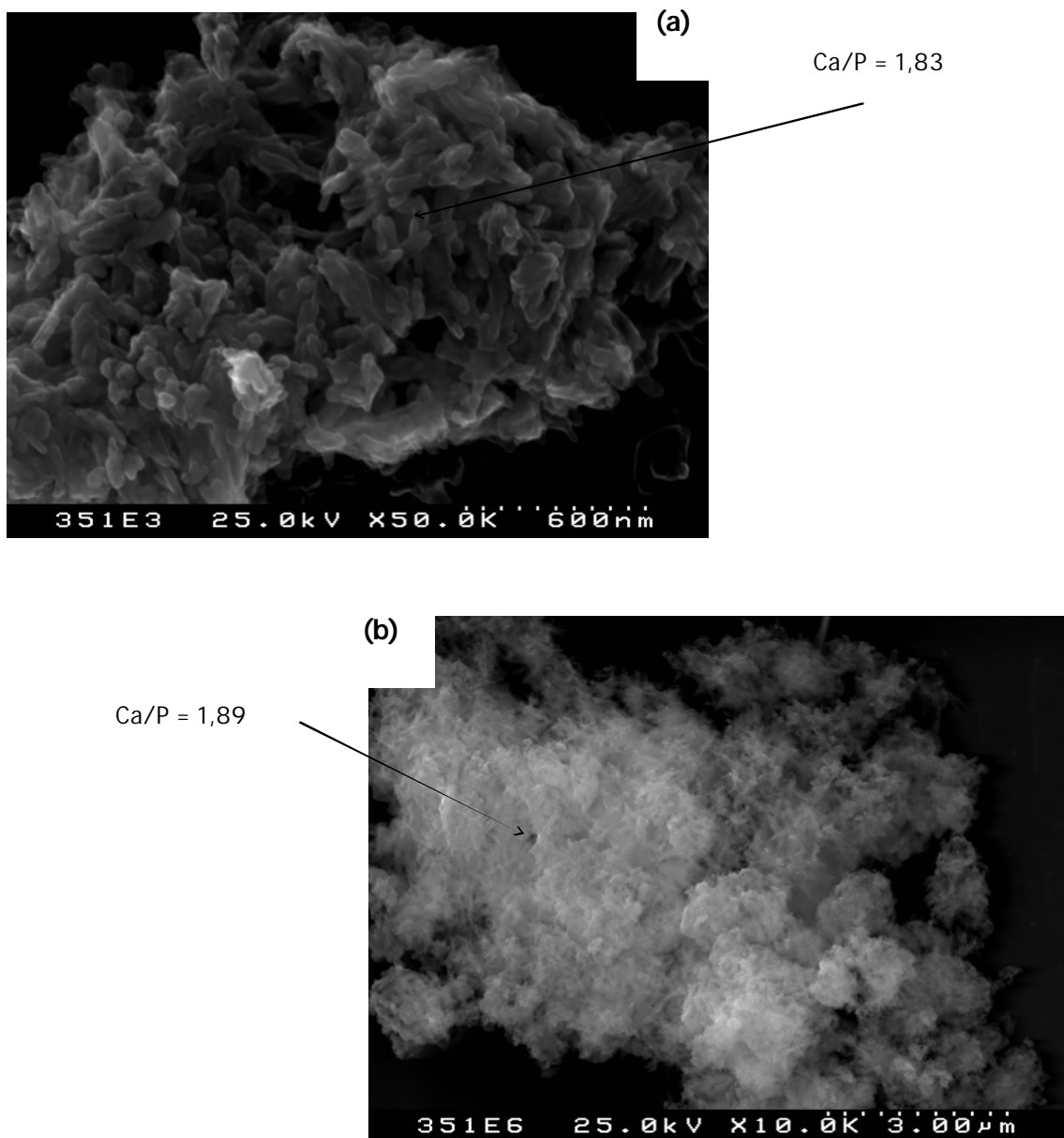


Figura 5.8: Aspecto morfológico da amostra 351 depois de envelhecida 1 hora **(a)** e 24 horas **(b)**, em SBF. Também são apresentados os valores da relação molar Ca/P obtida por EDS.

Como no caso dos sólidos anteriormente estudados, a análise de EDS da amostra 351 (depois de 1 e 24 horas a envelhecer) detectou a presença dos íons cálcio, fósforo, sódio, potássio, cloreto e magnésio (proveniente da solução de SBF).

Apresenta-se na figura 5.9, a variação do pH e das concentrações de cálcio e fósforo presentes na solução de SBF, em função do tempo de envelhecimento.

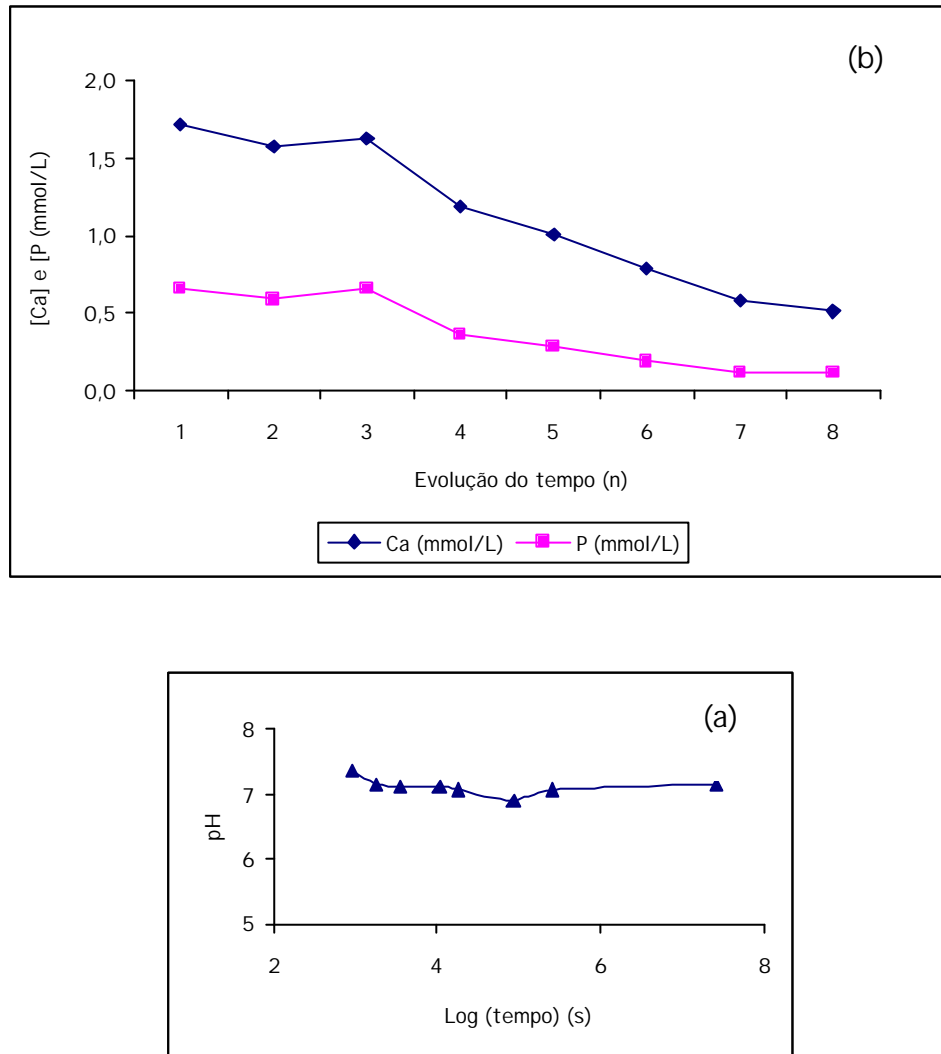


Figura 5.9: Evolução do pH **(a)** e da concentração de cálcio e fósforo **(b)**, presentes na solução de SBF, ao longo do envelhecimento da amostra 151.

5.4 CONCLUSÕES

Em resumo, como principal conclusão do trabalho experimental desenvolvido ao longo deste capítulo, poder-se-á afirmar que o envelhecimento de fosfatos de cálcio em SBF em condições (pH e temperatura) semelhantes às existentes no organismo, provoca alterações estruturais e morfológicas nas fases de fosfato inicialmente presentes.

Apresenta-se de seguida, um resumo das principais conclusões, retiradas a partir do trabalho experimental desenvolvido, para cada das fases de fosfato em estudo:

- ? O envelhecimento de DCPD durante 10 dias, em solução de SBF e em condições de temperatura e pH semelhantes às do corpo humano, parece promover a transformação de DCPD? OCP? HA. O OCP e a HA obtidos, apresentam substituição do ião cálcio pelos iões sódio e potássio sendo também observada a possível incorporação do ião cloreto nestes mesmos sólidos. A transformação do DCPD, nas condições experimentais em estudo, dever-se-á realizar por dissolução seguida da reprecipitação de uma outra fase;
- ? Ao fim de 10 dias de envelhecimento, parece ter ocorrido uma transformação parcial de OCP? HA. Tal como no caso do DCPD, a HA obtida apresentará substituições dos iões presentes em solução. A transformação OCP? HA realizar-se-á unicamente por precipitação;
- ? Após 10 dias de imersão, não se observou qualquer transformação de fase da HA. Contudo, foi observada a alteração morfológica desta fase de fosfato no decorrer do envelhecimento. Esta alteração dever-se-á fundamentalmente à incorporação, na sua estrutura, do ião magnésio presente na solução de SBF.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

Após a realização do trabalho experimental e tendo em consideração tudo o que foi anteriormente referido, poder-se-á concluir que poderiam ser realizadas outras experiências com o objectivo de esclarecer e/ou confirmar os resultados apresentados, nomeadamente:

- ? realizar mais sínteses das amostras estudadas, de forma a confirmar os resultados obtidos;
- ? deveriam ser realizadas sínteses de fosfatos de cálcio, nas mesmas condições de temperatura e pH, mas em sistemas fechados e com monitorização contínua da pressão parcial de CO₂. Este procedimento permitiria assegurar que todas as sínteses seriam realizadas exactamente nas mesmas condições de pH, temperatura e pressão;
- ? realizar réplicas das experiências de envelhecimento em SBF. Estas experiências poderiam esclarecer e/ou confirmar os resultados apresentados;
- ? realizar também experiências de envelhecimento dos sólidos obtidos a 45 °C, de forma a estudar as transformações sofridas pelas fases obtidas a uma temperatura de síntese mais elevada.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.2 ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS.....	3
1.3 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	5
 2. ASPECTOS IMPORTANTES DE ALGUNS FOSFATOS DE CÁLCIO BIOLOGICAMENTE RELEVANTES.....	 7
2.1 INTRODUÇÃO.....	7
2.1.1 Considerações termodinâmicas importantes.....	7
2.2 FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO (ACP).....	9
2.2.1 Ocorrência e importância biológica.....	9
2.2.2 Morfologia.....	10
2.2.3 Espectros de raios-X e de infravermelho	10
2.3 HIDROGENOFOSFATO DE CÁLCIO ANIDRO (DCPA), MONETITE.....	11
2.3.1 Origem e ocorrência	11
2.3.2 Estrutura cristalina.....	12
2.3.3 Espectro de DRX atribuído ao DCPA puro.....	13
2.4 FOSFATO DE CÁLCIO DI-HIDRATADO (DCPD), BRUSHITE	13
2.4.1 Ocorrência e importância biológica.....	13
2.4.2 Estrutura cristalina e morfologia.....	14
2.4.3 Decomposição térmica.....	16
2.4.4 Espectros de raios-X e infravermelho	16
2.5 FOSFATO OCTACÁLCICO (OCP)	17
2.5.1 Origem, ocorrência e importância biológica.....	17
2.5.2 Estrutura cristalina.....	18
2.5.3 Comportamento térmico.....	19
2.5.4 Espectros de raios-X e infravermelho característicos.....	21
2.6 FOSFATO TRICÁLCICO (? -TCP), WHITLOCKITE.....	21
2.6.1 Ocorrência e importância biológica.....	21
2.6.2 Espectro de raios-X e estrutura cristalina.....	22
2.7 HIDROXIAPATITE E OUTRAS APATITES	23
2.7.1 Apatites biológicas.....	23
2.7.2 Apatites sintéticas.....	24

2.7.2.1 Estrutura da fluoroapatite, da cloroapatite e da hidroxiapatite.....	24
2.7.2.2 Célula unitária da estrutura hexagonal da hidroxiapatite.....	25
2.7.2.3. Espectros de raios-X e de infravermelho característicos da HA.....	26
2.7.2.4 Comportamento térmico da hidroxiapatite.....	27
2.7.3 Apatites substituídas. Efeito de alguns iões substituintes.....	28
2.7.3.1 Introdução.....	28
2.7.3.2 Efeito do ião CO_3^{2-} . Substituições do tipo -A e -B.....	30
2.7.3.3 Efeito do ião Cl^-	32
2.7.3.4 Efeito dos iões Na^+ e K^+	32
2.7.4 Mecanismos de substituição possíveis.....	33
2.7.5 Espectro de Raman característico da hidroxiapatite.....	35
2.8 TRANSFORMAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO ACP, DCPD, OCP E HA.....	37
2.8.1 Introdução.....	37
2.8.2 Transformações, em solução, de alguns fosfatos de cálcio.....	38
2.8.2.1 ACP, Fosfato de cálcio amorfo.....	38
2.8.2.2 DCPD, Fosfato de cálcio di-hidratado.....	38
2.8.2.3 OCP, Fosfato octacálcico.....	39
2.8.2.4 HA, hidroxiapatite.....	40
3. MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE.....	41
3.1 INTRODUÇÃO.....	41
3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO.....	42
3.2.1 Reagentes e preparação de soluções.....	42
3.2.2 Técnicas experimentais usadas na caracterização dos sólidos obtidos.....	43
3.2.2.1 Análise termogravimétrica, TG.....	43
3.2.2.2 Difracção de Raios X, DRX.....	43
3.2.2.3 Espectroscopia de Infravermelho, IV.....	43
3.2.2.4 Espectroscopia de Raman com transformadas de Fourier, FTR.....	44
3.2.2.5 Espectroscopia por Emissão de Plasma Induzido, ICP.....	44
3.2.2.6 Microscopia Electrónica de Varrimento, SEM.....	44
3.3 ENVELHECIMENTO DE ALGUNS DOS FOSFATOS DE CÁLCIO SINTETIZADOS.....	45
3.3.1 Reagentes usados na preparação da solução de SBF.....	45
3.3.2 Técnicas experimentais utilizadas.....	45
4. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO.....	47
4.1 INTRODUÇÃO.....	47
4.2 MÉTODO DE SÍNTESE E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	48

4.3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	51
4.3.1 Caracterização dos sólidos obtidos em presença do íon CO_3^{2-}	51
4.3.2 Caracterização dos sólidos obtidos na presença dos íons Na^+ , Cl^- e CO_3^{2-} ..	68
4.3.3 Caracterização dos sólidos obtidos na presença de Na^+ , K^+ , Cl^- e CO_3^{2-}	76
4.4 ESPECTROS DE FT-RAMAN DE ALGUNS DOS SÓLIDOS OBTIDOS ...	79
4.5 CONCLUSÕES	81
 5. ENVELHECIMENTO EM SBF DE ALGUNS DOS FOSFATOS DE CÁLCIO SINTETIZADOS.....	83
5.1 INTRODUÇÃO.....	83
5.2 MÉTODO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	84
5.3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	86
5.3.1 Caracterização dos sólidos resultantes. Evolução do pH e das concentrações dos íons cálcio e fósforo presentes na solução de SBF	86
5.3.1.1 Sólido sem íons substituintes (caracterizado como sendo maioritariamente DCPD).....	86
5.3.1.2 Sólidos com e sem substituições de CO_3^{2-} , Na^+ , K^+ e Cl^- (caracterizados como sendo maioritariamente OCP)	91
5.3.1.3 Sólidos com e sem substituições de CO_3^{2-} , Na^+ , K^+ e Cl^- (caracterizados como sendo HA).....	96
5.4 CONCLUSÕES	99
 6. SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO	101

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- [1] M. A. Barbosa, "Os materiais e a vida: um osso duro de roer", *Colóquio/Ciências – Revista de Cultura Científica* **23** (1999) 33-43.
- [2] R. Z. LeGeros, in *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*, Edited by Howard M. Myers, San Francisco, Calif., 1991.
- [3] Mathai Mathew, Shozo Takagi, in *Octacalcium Phosphate: Monographs in Oral Science*, Edited by L. C. Chow, E. D. Eanes, Karger, Vol.18 (2001) 1-16.
- [4] B. B. Tomazic, I. Mayer, W. E. Brown, "Ion incorporation into octacalcium phosphate hydrolyzates", *Journal of Crystal Growth* **108** (1991) 670-682.
- [5] J. C. Elliot, in *Structure and Chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates: Studies in Inorganic Chemistry* 18, Elsevier, 1994.
- [6] J. L. Matthews, J. J. Reynolds, W. G. Robertson, and K. Simkiss, in *Biological Mineralization and Demineralization: report of the Dahlem Workshop on Biolog. Mineralization and Demineralization*, Edited by G. H. Nancollas, Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1982.
- [7] Jorgen Christoffersen, "Dissolution of Calcium Hydroxyapatite", *Calcif. Tissue Int.* **33** (1981) 557-560.
- [8] P. A. A. P. Marques, "*Síntese e Caracterização de Materiais Apatíticos (Hidroxiapatite com e sem substituições catiónicas de iões magnésio, potássio e sódio)*", Dissertação apresentada na Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Mestre, 1997.

- [9] G. R. Sauer, W. B. Zunic, J. R. Durig, and R. E. Wuthier, "Fourier Transform Raman Spectroscopy of Synthetic and Biological Calcium Phosphates", *Calcif. Tissue Int.* **54** (1994) 414-420.
- [10] R. Z. LeGeros, and J. P. LeGeros, in *An Introduction to Bioceramics*, Edited by Larry L. Hench & June Wilson, Singapore, World Scientific, 1993.
- [11] R. P. Shellis, B. R. Heywood, F. K. Wahab, "Formation of Brushite, Monetite and Whitlockite during Equilibration of Human Enamel with Acid Solutions at 37°C", *Caries Res.* **31** (1997) 71-77.
- [12] R. Z. LeGeros, "Apatites in biological systems", *Prog. Crystal Growth Charact.* **4** (1983) 1-45, *cit.* [2].
- [13] R. M. Biltz, E. D. Pelligrino, "The composition of recrystallized bone mineral", *Calcif. tissue In.* **36** (1984) 439-441, *cit.* [2].
- [14] F. C. M. Driessens, R. M. H. Verbeeck, "Dolomite as a possible magnesium-containing phase in human tooth enamel", *Calcif. Tissue Int.* **37** (1985) 376-380, *cit.* [2].
- [15] R. Z. LeGeros, S. R. Contigluglia, A. C. Alfrey, "Pathological calcifications associated with uremia: Two types of calcium phosphates deposits", *Calcif. Tissue Res.* **13** (1973) 173-185, *cit.* [2].
- [16] M. C. Glimcher, L. C. Bonar, M. D. Grynpas, W. J. Landis, A. H. Roufosse, "Recent studies in bone minerals: Is the amorphous calcium phosphate theory valid?", *J. Crystal Growth* **304** (1981) 100-119, *cit.* [2].

[17] C. U. Shepard, "On two new minerals, monetite and monite, with a notice of pyroclastite", **23** (1882) 400-405, *cit.* [5].

[18] C. Frondel, "Mineralogy of the calcium phosphates in insular phosphate rock", *Am. Miner.* **28** (1943) 215-232, *cit.* [5].

[19] R. Z. LeGeros, I. L. Shannon, "The crystalline components of dental calculi: Human vs dog", *J. Dent. Res.* **17** (1983) 419-429, *cit.* [2].

[20] G. Faure, P. Netter, B. Malam, J. Steinmetz, "Scanning electron microscopic study of microcrystals implicated in human rheumatic diseases", *Scan. Electr. Microsc.* (1980) 163-176, *cit.* [2].

[21] T. P. Feenstra and P. L. de Bruyn, "Formation of Calcium Phosphates in Moderately Supersaturated Solutions", *The Journal of Physical Chemistry* **83** (4) (1979) 475-479.

[22] J. F. De Rooij, J. C. Heughebaert, and G. H. Nancollas, "A pH study of Calcium Phosphate Seeded Precipitation", *Journal of Colloid and Interface Science* **100** (2) (1984) 350-358.

[23] J. C. Heughebaert, S. J. Zawachi, and G. H. Nancollas, "The Growth of Nonstoichiometric Apatites from Aqueous Solution at 37°C: I. Methodology and Growth at pH 7.4", *Journal of Colloid and Interface Science* **135** (1) (1990) 20-32.

[24] S. J. Zawachi, J. C. Heughebaert, and G. H. Nancollas, "The Growth of Nonstoichiometric Apatites from Aqueous Solution at 37°C: II. Effects of pH upon the Precipitated Phase", *Journal of Colloid and Interface Science* **135** (1) (1990) 33-44.

[25] F. Abbona and M. Franchini-Angela, "Crystallization of hydroxyapatite from very dilute solutions", *N. Jb. Miner. Mh.* **H.12** (1995) 563-575.

[26] Mayumi Iijima, Hideo Kamemizu, Nobukazu Wakamatsu, Takayasu Goto, Yutaka Doi, Yutaka Moriwaki, "Effects of Ca addition on the formation of octacalcium phosphate and apatite in solution at pH 7.4 and at 37°C", *Journal of Crystal Growth* **193** (1998) 182-188.

[27] Mayumi Iijima, Yutaka Moriwaki, "Effects of ionic inflow and organic matrix on crystal growth of octacalcium phosphate; relevant to tooth enamel formation", *Journal of Crystal Growth* **198/199** (1999) 670-676.

[28] P. G. D. Inácio, P. A. A. P. Marques and M. C. F. Magalhães, "Effect of temperature and reactant addition time on the synthesis of octacalcium phosphate as a precursor on the crystallisation of hydroxyapatite as biomaterial", *Phosphorus Research Bulletin* **10** (1999) 295-300.

[29] C. A. Beevers and D. B. McIntyre, "The Atomic Structure of Fluorapatite and its Relation to that of Tooth and Bone Mineral", *Miner. Mag.* **27** (1956) 254-259.

[30] J. F. Kay, "Calcium Phosphate Coatings for Dental Implants", *Dent. Clin. North. Amer.* **36** (1992) 1-18.

[31] R. Despotovic, N. Filipovic-Vincekovic and H. Füredi-Milhofer, "Preparation of Calcium Phosphates from Electrolyte Solutions", *Calcif. Tiss. Res.* **18** (1975) 13-26.

[32] John L. Meyer and Bruce O. Fowler, "Lattice Defects in Nonstoichiometric Calcium Hydroxyapatites. A Chemical Approach", *Inorg. Chem.* **21** (1982) 3029-3035.

- [33] Y. Doi, Y. Moriwaki, T. Aoba, M. Okazaki, J. Takahashi and K. Joshin, "Carbonate Apatites from Aqueous and Non- Aqueous Media Studied by ESR, IR and X-Ray Diffraction: Effect of NH_4^+ Ions on Crystallographic Parameters", *J. Dent. Res.*, Vol. 61, No. 2 (1982) 429-434.
- [34] F. C. M. Driessens, R. M. H. Verbeeck, and H. J. M. Heijligers. "Some physical Properties of Na- and CO_3^{2-} Containing Apatites Synthesized at High Temperatures", *Inorganica Chimica Acta* **80** (1983) 19-23.
- [35] Günter Binder and Georg Troll, "Coupled anion substitution in natural carbon-bearing apatites", *Contrib. Mineral Petrol* **101** (1989) 394-401.
- [36] E. G. Nordström, K. H. Karlsson, "Carbonated-doped hydroxyapatite", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1** (1990) 182-184.
- [37] C. Rey, M. Frèche, M. Heughebaert, J. C. Heughebaert, J. L. Lacout, A. Lebugle, J. Szilagyí and M. Vignoles, "Apatite Chemistry in Biomaterial Preparation, Shaping and Biological Behaviour", *Bioceramics* **4** (1991) 57-63.
- [38] N. J. Mathers, J. T. Czernuszka, "Growth of hydroxyapatite on type 1 collagen", *Journal of Materials Science Letters* **10** (1991) 992-993
- [39] Erna A. P. De Maeyer, Ronald M. H. Verbeeck, and Didier E. Naessens, "Stoichiometry of Na^+ and CO_3^{2-} Containing Apatites Obtained by Hydrolysis of Monetite", *Inorg. Chem.* **32** (1993) 5709-5714.
- [40] A. Bigi, G. Falini, E. Foresti, M. Gazzano, A. Ripamonti, and N. Roveri, "Magnesium Influence on Hydroxyapatite Crystallization", *Journal of Inorganic Biochemistry* **49** (1993) 69-78.

[41] Giancarlo Bocchi and Giovanni Valdre, "Physical, Chemical, and Mineralogical Characterization of Carbonate-Hydroxyapatite Concretions of the Human Pineal Gland", *Journal of Inorganic Biochemistry* **49** (1993) 209-220.

[42] M. Vaivada, A. Dindune, Z. Konstants, "Synthesis and properties of Hydroxyapatite", *Latvijas Kimijas Zurnals* **5** (1993) 515-519.

[43] Erna A. P. De Maeyer, Ronald M. H. Verbeeck, and Didier E. Naessens, Effect of Heating on the Constitution of Na^+ and CO_3^{2-} Containing Apatites Obtained by Hydrolysis of Monetite", *Inorg. Chem.* **33** (1994) 5999-6006.

[44] Erna A. P. De Maeyer, Ronald M. H. Verbeeck, and Didier E. Naessens, "Optimalization of the preparation of Na^+ and CO_3^{2-} Containing Apatites Obtained by Hydrolysis of Monetite", *Journal of Crystal Growth* **135** (1994) 539-547.

[45] E. A. P. De Maeyer, and R. M. H. Verbeeck, "Incorporation of Na^+ , K^+ , and CO_3^{2-} in Heterogeneously Precipitated Calciumhydroxyapatites", *12th European Conference on Biomaterials*, Porto, 1995

[46] Ronald M. H. Verbeeck, Erna A. P. De Maeyer, and Ferdinand C. M. Driessens, "Stoichiometry of Potassium⁺ and Carbonate Containing Apatites Synthesized by Solid State Reactions", *Inorg. Chem.* **34** (1995) 2084-2088.

[47] F. J. G. Cuisinier, P. Steuer, J. C. Voegel, "Structural analyses of carbonate-containing apatite samples related to mineralized tissues", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **6** (1995) 85-89.

[48] Jianguo Li, Hailhong Liao and Malena Sjöström, "Characterization of calcium phosphates precipitated from simulated body fluid of different buffering capacities", *Biomaterials* **18** (1997) 743-747.

[49] Erna A. P. De Maeyer, Ronald M. H. Verbeeck, and Ilse Y. Pieters, "Effect of K^+ on the Stoichiometry of Carbonated Hydroxyapatites Obtained by Hydrolysis of Monetite", *Inorg. Chem.* **35** (1996) 857-863.

[50] Achilles Tsortos, Shinpei Ohki, Anita Zieba, Robert E. Baier, and George H. Nancollas, "The Dual Role of Fibrinogen as Inhibitor and Nucleator of Calcium Phosphate Phases: The Importance of Structure", *Journal of Colloid and Interface Science* **177** (1996) 257-262.

[51] Wenju Wu and George H. Nancollas, "Interfacial Free Energies and Crystallization in Aqueous Media", *Journal of Colloid and Interface Science* **182** (1996) 365-373.

[52] Y. Liu, W. Wu, G. Sethuraman, G. H. Nancollas, "Intergrowth of calcium phosphates: an interfacial energy approach", *Journal of Crystal Growth* **174** (1997) 386-392.

[53] Wenju Wu and George H. Nancollas, "Factors controlling crystallization of calcium phosphates on solid surfaces", *Bioceramics* Vol.11 (1998) 469-472.

[54] Elena I. Suvorova, Hans E. Lundager Madsen, "Observation by HRTEM the hydroxiapatite-octacalcium phosphate interface in crystals grown from aqueous solutions", *Journal of Crystal Growth* **198/199** (1999) 677-681.

[55] Gigliola Lusvardi, Ledi Menabue, Monica Saladini, "Reactivity of biological and synthetic hydroxyapatite towards $Zn(II)$ ion, solid-liquid investigations", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **13** (2002) 91-98.

- [56] E. D. Eanes, I. H. Gillessen and A. S. Posner, "Mechanism of conversion of non-crystalline calcium phosphate to crystalline hydroxyapatite", *Crystal Growth. Proceedings of an International Conference on Crystal Growth*, Boston, 1966.
- [57] E. D. Eanes and J. L. Meyer, "The Maturation of Crystalline Calcium Phosphates in Aqueous Suspensions at Physiologic PH", *Calcif. Tiss. Res.* **23** (1977) 259-269.
- [58] J. L. Meyer and E. D. Eanes, "A thermodynamic Analysis of the Secondary Transition in the Spontaneous Precipitation of Calcium Phosphate", *Calcif. Tiss. Res.* **25** (1978) 209-216.
- [59] M. Okazaki, Y. Moriwaki, T. Aoba, Y. Doi, J. Takahashi, "Solubility Behavior of CO₃ Apatites in Relation to Crystallinity", *Caries Res.* **15** (1981) 477-483.
- [60] M. Okazaki, Y. Moriwaki, T. Aoba, Y. Doi, J. Takahashi, H. Kimura, "Crystallinity Changes of CO₃ Apatites in Solutions at Physiological pH", *Caries Res.* **16** (1982) 308-314.
- [61] J. D. B. Featherstone, C. P. Shields, B. Khademazad, and M. D. Oldershaw, "Acid reactivity of Carbonated Apatites with Strontium and Fluoride Substitutions", *J. Dent. Res.* **62**(10) (1983) 1049-1053.
- [62] F. B. Bagambisa, "The behaviour of hydroxyapatite ceramics in an aqueous environment", *Journal of Materials Science* **25** (1990) 5091-5095.
- [63] O. Suzuki, H. Yagishita, T. Amano, and T. Aoba, "Reversible Structural Changes of Octacalcium Phosphate and Labile Acid Phosphate", *J. Dent. Res.* **74**(11) (1995) 1764-1769.

[64] Stephan Graham, Paul W. Brown, "Reactions of octacalcium phosphate to form hydroxyapatite", *Journal of Crystal Growth* **165** (1996) 106-115.

[65] F. Sugihara, H. Oonishi, S. Kushitani, N. Iwaki, Y. Mandai, K. Minamigawa, E. Tshuji, M. Yoshikawa, and T. Toda, "Bone Tissue Reaction of Octacalcium Phosphate", *Bioceramics* Vol.8 (??) 89-91.

[66] R. Z. LeGeros, "*Crystallographic studies of the carbonate substitution in the apatite structure*", PhD thesis, New York University (1967), *cit.* [2].

[67] R. Z. LeGeros, J. P. LeGeros, "Carbonate analyses of synthetic, mineral and biological apatites", *J. Dent. Res.* abstr 808 (1983) 62:259, *cit.* [2].

[68] G. Bonel, J. C. Labbarthe and C. Vignoles, *Colloques Int. CNRS* **230** (1975) 117, *cit.* [33].

[69] Erna A. P. De Maeyer and Ronald M. H. Verbeeck, "Possible Substitution Mechanisms for Sodium and Carbonate in Calcium Hydroxyapatite", *Bull. Soc. Chim. Belg.* Vol.102 (1993).

[70] I. Rehman, R. Smith, L. L. Hench, and W. Bonfield, "Structural evaluation of human and sheep bone and comparison with synthetic hydroxyapatite by FT-Raman spectroscopy", *Journal of Biomedical Materials Research* **29** (1995) 1287-1294.

[71] R. E. Wuthier, G. S. Rice, J. E. B. Wallace, R. L. Weaver, R. Z. LeGeros, E. D. Eanes, "In vitro precipitation of calcium phosphate under intercellular conditions: Formation of Brushite forms an amorphous precursor in the absence of ATP", *Calcif. Tissue Int.* **37** (1981) 401-410.

[72] P. T. Cheng, J. J. Grabher, R. Z. LeGeros, "Effect of Mg on calcium phosphate", *Magnesium* **7** (1988) 123-132, *cit.* [2].

[73] W. E. Brown, "Crystal structure of octacalcium phosphate", *Nature* (1962) 196-1048, *cit.* [2].

[74] R. Z. LeGeros, D. Lee, G. Quirolgico, W. P. Shirra, L. Reich, "In vitro formation of dicalcium phosphate dihydrate, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (DCPD)", *Scan. Electron. Microsc.* (1983) 407-418, *cit.* [2].

[75] R. Z. LeGeros, G. Daculsi, R. Kijkowska, B. Kerebel, "The effect of magnesium on the formation of apatites and whitlockites", *Proc. Magnesium Symposium: Magnesium in Health and Disease* (1989) 11-19, *cit.* [2].

[76] R. Z. LeGeros, R. Kijkowska, D. J. LeGeros, "Formation and transformation of octacalcium phosphate, OCP: A preliminary report", *Scan. Electron. Microsc.* **IV** (1984) 1771-1777, *cit.* [2].

[77] R. Z. LeGeros, J. P. LeGeros, "Brushite crystals grown by diffusion", *Journal of Crystal Growth* **13** (1972) 476-480, *cit.* [2].

[78] B. Leite Ferreira, Paula G. D. Inácio, Nuno R. Faria, M. Clara F. Magalhães, R. N. Correia, "Influência dos iões sódio, cloreto e carbonato na síntese da hidroxiapatite e seus precursores", *Apresentação em poster. Congresso da Sociedade Portuguesa de Química* (2001).

[79] B. O. Fowler, E. C. Moreno, W. E. Brown, "Infrared spectra of hydroxyapatite octacalcium phosphate and pyrolyzed octacalcium phosphate", *Arch. Oral Biol.* **11** (1966) 477-492, *cit.* [2].

[80] C. W. Anderson, R. A. Beebe, J. S. Kittelberger, "Programmed temperature dehydration studies of octacalcium phosphate", *Journal of Phys. Chem.* **78** (1974) 1631-1635, *cit.* [5].

[81] Chicara Ohtsuki, Tadashi Kokubo and Takao Yamamuro, "Mechanism of apatite formation on CaO-SiO₂-P₂O₅ glasses in a simulated body fluid", *Journal of Non-Crystalline Solids* **143** (1992) 84-92.

[82] G. Bacquet, Vo Quang Truong, M. Vignoles, G. Bonel, " EPR detection of acetate ions trapping in B-type carbonated fluoroapatites", *Journal Solid Chem.* **39** (1981) 148-153, *cit.* [5].

[83] I. Khattech, M Jemal, "Sur la décomposition thermique d'apatites précipitées en presence d'ions acetate", *Ann. Chim.* **10** (1985) 653-656, *cit.* [5].

[84] M. Jemal, I. Khattech, "Simultaneous thermogravimetry and gas chromatography during decomposition of carbonate apatites", *Thermochim. Acta* **152** (1989) 65-76, *cit.* [5].

[85] I. Rehman, R. Smith, L. L. Hench, and W. Bonfield, "Structural evaluation of human and sheep bone and comparison with synthetic hydroxyapatite by FT-Raman spectroscopy", *Journal of Biomedical Materials Research* **29** (1995) 1287-1294.